



David Filipe Salgueiro Pires

Licenciado em Biologia

Nanoconjugados para Gene Silencing

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em
Bioquímica

Orientador: Prof. Doutor Pedro Miguel Ribeiro Viana Baptista,
Professor Catedrático, Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Prof. Doutora Maria Alexandra Nuncio de
Carvalho Ramos Fernandes, Professora Auxiliar, Faculdade
de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa



Dezembro de 2020

**UNIVERSIDADE NOVA DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIAS
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA VIDA**

Licenciado em Biologia

David Filipe Salgueiro Pires

Nanoconjugados para Gene Silencing

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre no
Mestrado em Bioquímica, pela Universidade Nova de
Lisboa, Faculdade de Ciências e Tecnologias

Orientador: Prof. Doutor Pedro Miguel Ribeiro Viana Baptista,
Professor Catedrático, Faculdade de Ciências e Tecnologia da
Universidade Nova de Lisboa

Co-orientador: Prof. Doutora Maria Alexandra Nuncio de
Carvalho Ramos Fernandes, Professora Auxiliar, Faculdade
de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa

Dezembro de 2020

Nanoconjugados para Gene Silencing

Copyright ©

David Filipe Salgueiro Pires

Faculdade de Ciências e Tecnologia

Universidade Nova de Lisboa

A Faculdade de Ciências e Tecnologia e a Universidade Nova de Lisboa têm o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar esta dissertação através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, e de a divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.

Resumo

O cancro continua a ser um desafio médico complexo e uma das principais causas de morte no mundo. Mobiliza grandes quantidades de recursos anualmente, procurando entender os mecanismos que lhe são adjacentes, de forma encontrar um tratamento eficiente. A nanomedicina tem tido um papel ativo no desenvolvimento de ferramentas inovadoras para o diagnóstico e tratamento do cancro, por exemplo, na criação de estratégias de entrega de ácidos nucleicos mediados por nanopartículas de ouro (AuNPs). Estas estratégias tiram partido do tamanho, forma, propriedades de superfície, e facilidade de funcionalização com diferentes biomoléculas das mesmas, formando sistemas de entrega eficientes. Neste trabalho, procurámos utilizar o sistema ASOs de forma a tentar silenciar a expressão genética de *KRAS*, e perceber a capacidade de discriminação diferencial do sistema para com os seus alvos moleculares. *KRAS* é um proto-oncogene que quando mutado se encontra constitutivamente ativo, sendo responsável por desencadear cascatas de fosforilação que resultam na formação e desenvolvimento de células cancerígenas, escapando aos pontos de controlo do ciclo celular. Assim, foram construídos Au-nanoconjugados anti-*KRAS*, direcionados às sequências específicas de mRNA expressas nas linhagens HCT116 e HT29, duas linhas celulares imortalizadas de cancro colorretal. A ativação deste oncogene encontra-se mutada em 50% dos casos de cancro colorretal, o terceiro cancro mais incidente no mundo, em 2018, e o segundo mais mortal. Nesta tese, foram conseguidas reduções na expressão genética de *KRAS* de até 45%, podendo estas ser ainda aumentadas futuramente através de estudos de otimização (concentrações utilizadas, tempos de incubação) e de especificidade.

Termos chave: Cancro; Nanopartículas de Ouro; Nanomedicina; ASOs; *KRAS*.

Abstract

Cancer continues to be a complex medical challenge and one of the main causes of death in the world. Mobilizing large amounts of resources annually, trying to understand the mechanisms that are adjacent to it, in order to find an efficient treatment. Nanomedicine has played an active role in the development of innovative tools for the diagnosis and treatment of cancer, for example, in the creation of nucleic acid delivery strategies mediated by gold nanoparticles (AuNPs). These strategies take advantage of the size, shape, surface properties of AuNP, and their ease of functionalization with different biomolecules, forming efficient delivery systems. In this work, we tried to use the ASOs system in order to silence the gene expression of *KRAS*, and to understand the system's differential discrimination capacity towards its molecular target. *KRAS* is a proto-oncogene that when mutated is constitutively active, being responsible for triggering phosphorylation cascades that result in the formation and development of cancer cells, escaping the control points of the cell cycle. Thus, anti-*KRAS* Au-nanoconjugates were constructed, targeting the specific mRNA sequences expressed in the HCT116 and HT29 lines, two immortalized colorectal cancer cell lines. Activation of this oncogene is mutated in 50% of colorectal cancer cases, the third most incident cancer in the world in 2018, and the second most deadly. In this thesis, reductions in genetic expression of *KRAS* of up to 45% were achieved, which can be further increased in the future through studies of optimization (concentrations used, incubation times) and specificity.

Keywords: Cancer; Gold Nanoparticles; Nanomedicine; ASOs; *KRAS*.

Índice

Resumo	V
Abstract	VII
Lista de Publicações	XIII
Índice de Figuras	XV
Índice de Tabelas	XIX
Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos	XXI
Lista de Equações	XXIII
1. Introdução	1
1.1. Cancro - Notas Gerais.	3
1.1.1. Taxas de incidência no Mundo	3
1.1.2. Taxas de incidência na Europa	5
1.1.3. Taxas de incidência em Portugal	7
1.1.4. Agentes causadores do cancro e Fatores de risco.	8
1.1.5. Cancro colorretal.	9
1.2. Carcinogénese e Oncogénese.....	10
1.2.1. Formação de células cancerígenas.	10
1.2.2. Regulação do ciclo celular.	11
1.2.3. Ativação de oncogenes.	13
1.2.4. Inativação de genes supressores de tumores.	13
1.3. Classificação dos estados de progressão do cancro.	14
1.4. A família RAS.	15
1.4.1. Influência de KRAS nas vias metabólicas.	16
1.4.2. Mutações em <i>KRAS</i>	17
1.5. Terapia	18
1.5.1. Cirurgia	18
1.5.2. Radioterapia	19
1.5.3. Quimioterapia	19
1.5.4. Terapia Genética	20
1.6. Resistência do cancro ao tratamento.	21
1.7. Nanomedicina	23
1.7.1. Nanopartículas de ouro.	25
2. Objetivos	27
3. Materiais e Métodos	31
3.1. Materiais	33
3.1.1. Lista de reagentes	33

3.1.2. Soluções	34
3.1.3. Lista de <i>primers</i>	34
3.1.4. Lista de oligonucleotídeos silenciadores.	34
3.1.5. Lista de equipamento	35
3.1.6. Lista de materiais	35
3.2. Métodos	35
3.2.1. Linhas celulares humanas	35
3.2.1.1. Características	35
3.2.1.2. Manutenção das culturas celulares	36
3.2.2. Análise mutacional das linhagens ao nível do DNA genómico (gDNA)	37
3.2.2.1. Extração do gDNA	37
3.2.2.2. Amplificação do gDNA	37
3.2.3. Nanoconjugados de ouro (Au-nanoconjugados).	38
3.2.3.1. Síntese de nanopartículas de ouro	38
3.2.3.2. Funcionalização com polietilenoglicol (PEG)	38
3.2.3.3. Preparação dos oligonucleotídeos silenciadores.	38
3.2.3.4. Síntese dos Au-nanoconjugados	39
3.2.3.5. Caracterização	39
3.2.3.5.1. Espectroscopia UV-Visível (UV-Vis)	39
3.2.3.5.2. <i>Dynamic Light Scattering</i> (DLS)	40
3.2.3.6. Teste de estabilidade	40
3.2.4. Expressão genética	40
3.2.4.1. Ensaio celular	40
3.2.4.2. Extração do RNA total	41
3.2.4.3. Síntese de cDNA	41
3.2.4.4. Teste de <i>primers</i> para RT-qPCR	42
3.2.4.5. <i>Real-Time quantitative</i> PCR (RT-qPCR)	43
3.2.5. Viabilidade celular	43
3.2.5.1. MTS	43
4. Resultados e Discussão	45
4.1. Caracterização da linhagem celular tumoral.	47
4.2. Análise do perfil de <i>KRAS</i>	48
4.3. Au-nanoconjugados	52
4.3.1. Síntese	52
4.3.2. Desenho dos oligonucleotídeos silenciadores (ASOs)	53
4.3.3. Caracterização dos Au-nanoconjugados	58
4.3.3.1. Caracterização UV-Vis	58

4.3.3.2. Caraterização DLS	59
4.3.4. Teste de estabilidade	61
4.4. Avaliação da expressão de <i>KRAS</i>	62
4.4.1. Silenciamento <i>KRAS</i> em HCT116	65
4.4.2. Viabilidade celular	68
5. Conclusões e Perspetivas Futuras	71
6. Bibliografia	75
7. Anexos	83
7.1. Preparação das soluções utilizadas	85
7.2. Sequência <i>KRAS</i> (NCBI)	85
7.3. Desenho de <i>primers</i>	86
7.4. Sequenciação Sanger	86
7.5. Sequências correspondentes aos testes de <i>primers</i> para RT-qPCR	89

Lista de Publicações

Ferreira D, Fontinha D, Martins C, Pires D, Fernandes AR, Baptista P V. Gold nanoparticles for vectorization of nucleic acids for cancer therapeutics. *Molecules*. 2020;25(15).

Índice de Figuras

Figura 1.1- Índices de incidência e de mortalidade das vítimas de cancro à escala mundial, em 2018.	4
Figura 1.2- Distribuição de casos de incidência e de mortalidade dos vários tipos de cancro, no mundo, em 2018, pelo sexo masculino e feminino.	5
Figura 1.3- Índices de incidência e de mortalidade das vítimas de cancro, na Europa, em 2018.	5
Figura 1.4- Distribuição de casos de incidência e de mortalidade dos vários tipos de cancro, na Europa, em 2018, pelo sexo masculino e feminino.	6
Figura 1.5- Índices de incidência e de mortalidade das vítimas de cancro, em Portugal, em 2018.	7
Figura 1.6- Distribuição de casos de incidência e de mortalidade dos vários tipos de cancro, em Portugal, em 2018, pelo sexo masculino e feminino.	8
Figura 1.7- Representação esquemática do ciclo celular, incluindo as diversas etapas, os seus checkpoints, e as proteínas impulsionadoras envolvidas em cada etapa.	12
Figura 1.8- Vias de sinalização celular influenciadas pela ativação de <i>KRAS</i>	16
Figura 1.9- Frequência das mutações em <i>KRAS</i> nos vários tipos de cancro humano	17
Figura 4.1- Curva de crescimento das linhas celulares em estudo (HCT116 e HT29).	47
Figura 4.2- Eletroforese em 0,8% de gel de agarose (70 V, 1h) referente à integridade dos ácidos nucleicos extraídos das linhagens tumorais humanas HCT116 e HT29.	49
Figura 4.3- Eletroforese em 1,5% de gel de agarose (80 V, 1h10) para verificação dos tamanhos (pb) de sequência amplificados por PCR, após extração a partir das linhagens tumorais humanas HCT116 e HT29.	50
Figura 4.4- Sequenciação Sanger realizada pela STABVIDA (Caparica, Portugal) das amostras de gDNA extraídas da linhagem celular tumoral HCT116, previamente amplificadas por PCR.	51
Figura 4.5- Sequenciação Sanger realizada pela STABVIDA (Caparica, Portugal) das amostras de gDNA extraídas da linhagem celular tumoral HT29, previamente amplificadas por PCR. ..	52
Figura 4.6- Esquema base da construção dos oligonucleotídeos silenciadores anti- <i>KRAS</i>	54
Figura 4.7- Estrutura do oligonucleotídeo silenciador anti- <i>KRAS</i> WT desenhado, obtida através do NUPACK.	54
Figura 4.8- Estrutura do oligonucleotídeo silenciador anti- <i>KRAS</i> G13D desenhado, obtida através do NUPACK.	54
Figura 4.9- Estrutura dos oligonucleotídeos anti- <i>KRAS</i> WT e anti- <i>KRAS</i> G13D desenhados, obtida através da ferramenta “ <i>hairpin</i> ” do idtdna.	55

Figura 4.10- Emparelhamento das sequências de oligonucleotídeos anti- <i>KRAS</i> WT e anti- <i>KRAS</i> G13D desenhados, com eles próprios, e correspondentes ΔG 's, obtidos através da ferramenta “ <i>selfdimer</i> ” do <i>itdna</i>	55
Figura 4.11- Emparelhamento das sequências de oligonucleotídeos anti- <i>KRAS</i> WT e anti- <i>KRAS</i> G13D desenhados, com os correspondentes cDNA-alvo, e correspondentes ΔG 's, obtidos através da ferramenta “ <i>heterodimer</i> ” do <i>itdna</i>	56
Figura 4.12- Estruturas de possíveis oligonucleotídeos silenciadores anti-codão13 de <i>KRAS</i> , correspondendo a permutações teóricas dos oligonucleotídeos silenciadores utilizados para futuros estudos de otimização de construção de sondas silenciadoras anti- <i>KRAS</i> , obtida através do NUPACK.	57
Figura 4.13- Espectros de absorvância UV-Vis dos sistemas de entrega em estudo (AuNP@citrato, AuNP@PEG, AuNP@PEG@WT e AuNP@PEG@G13D).	58
Figura 4.14- Caracterização DLS dos sistemas de entrega utilizados (AuNP@citrato, AuNP@PEG, AuNP@PEG@WT e AuNP@PEG@G13D).	60
Figura 4.15- Teste de estabilidade dos sistemas de entrega utilizados (AuNP@citrato, AuNP@PEG, AuNP@PEG@WT e AuNP@PEG@G13D), em tampão fosfato, numa gama de pH 5 a pH 8.	62
Figura 4.16- Eletroforese em 2% de gel de agarose (80 V, 2h12) efetuada para averiguar qual o par de <i>primers</i> a utilizar nos estudos de expressão genética por RT-qPCR.	63
Figura 4.17- Sequenciação Sanger realizada pela STABVIDA (Caparica, Portugal) das amostras de cDNA amplificadas correspondentes à linhagem celular tumoral HCT116.	64
Figura 4.18- Esquematização dos ensaios celulares realizados em placas de 24 poços.	65
Figura 4.19- Alteração da expressão genética relativa de <i>KRAS</i> após exposição de células tumorais HCT116 aos sistemas de entrega em estudo (AuNP@citrato, AuNP@PEG, AuNP@PEG@WT e AuNP@PEG@G13D).	67
Figura 4.20- Ensaios MTS relativos à viabilidade celular da linhagem tumoral HCT116 após exposição aos sistemas de entrega em estudo (AuNP@citrato, AuNP@PEG, AuNP@PEG@WT e AuNP@PEG@G13D).	69
Figura 7.1- Sequenciação Sanger efetuada pela STABVIDA à linha celular tumoral HCT116 com o <i>primer forward</i>	86
Figura 7.2- BLASTn da sequenciação HCT116+F contra o genoma humano (NCBI).	87
Figura 7.3- Sequenciação Sanger efetuada pela STABVIDA à linha celular tumoral HCT116 com o <i>primer reverse</i>	87
Figura 7.4- BLASTn da sequenciação HCT116+F contra o genoma humano (NCBI).	87
Figura 7.5- Sequenciação Sanger efetuada pela STABVIDA à linha celular tumoral HT29 com o <i>primer forward</i>	88
Figura 7.6- BLASTn da sequenciação HT29+F contra o genoma humano (NCBI).	88

Figura 7.7- Sequenciação Sanger efetuada pela STABVIDA à linha celular tumoral HT29 com o <i>primer reverse</i>	88
Figura 7.8- BLASTn da sequenciação HT29+R contra o genoma humano (NCBI).	89

Índice de Tabelas

Tabela 1.1- Estados de desenvolvimento do cancro. Significado da escala numérica.	15
Tabela 1.2- Tipos de NPs usadas como vetores de entrega na terapia do cancro	24
Tabela 1.3- Tipos de AuNPs mais comunmente utilizados na terapia do cancro	26
Tabela 3.1- Lista de reagentes utilizados.	33
Tabela 3.2- Lista de <i>primers</i> utilizados.	34
Tabela 3.3- Lista de oligonucleotídeos silenciadores utilizados.	34
Tabela 3.4- Lista de equipamento utilizado.	35
Tabela 3.5- Lista de materiais utilizados.	35
Tabela 3.6- Caraterísticas das linhagens celulares tumorais estudadas (origem, morfologia e propriedades).	36
Tabela 3.7- Componentes da mistura de reação e respetivos volumes utilizados. Volume final de 10 µL.	42
Tabela 4.1- Valores experimentais fornecidos pelo NanoDrop, a partir de amostras de gDNA extraído de linhas celulares HCT116 e HT29.	48
Tabela 4.2- Caraterização dos sistemas de entrega utilizados (AuNP@citrato, AuNP@PEG, AuNP@PEG@WT e AuNP@PEG@G13D) por UV-Vis e DLS.	61

Lista de Abreviaturas, Siglas e Símbolos

A2780 - Linha proveniente de um carcinoma de ovário humano;

A549 – Linha celular tumoral proveniente de um carcinoma pulmonar humano;

Abs – Absorvância;

APC - do inglês, *Adenomatous polyposis coli*;

ASCO – do inglês, American Society of Clinical Oncology;

ATCC - do inglês, American Type Culture Collection;

AJCC – do inglês, American Joint Committee on Cancer;

Au-nanoconjugado – Nanoconjugado de ouro;

AuNPs – Nanopartículas de ouro;

AuNP@citrato – Nanopartículas de ouro com revestimento de citrato;

AuNP@PEG – Nanopartículas de ouro funcionalizadas com PEG;

AuNP@PEG@oligo – Nanopartículas de ouro funcionalizadas com PEG e com oligonucleotídeos ssDNA *antisense*;

AuNP@PEG@sondaWT – Nanopartículas de ouro funcionalizadas com PEG e um oligonucleotídeo ssDNA *antisense* específico para o alelo selvagem do gene KRAS;

AuNP@PEG@sondaG13D – Nanopartícula de ouro funcionalizadas com PEG e um oligonucleotídeo ssDNA *antisense* específico para a mutado p.G13D do gene KRAS;

CCR - Cancro colorretal;

CDKs - do inglês, *Cyclin-dependent protein kinases*;

COSMIC – do inglês, Catalogue of Somatic Mutations in Cancer;

Ct – do inglês, *Threshold cycle*;

DEPC – Pirocarbonato de dietilo;

DLS – do inglês, *Dynamic Light Scattering*;

DMEM – do inglês, *Dulbecco's Modified Eagle Medium*;

DMSO – Dimetilsulfóxido;

DTT – Ditiotreitól;

EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético;

EGFR – do inglês, *epidermal growth factor receptor*;

ETPN – do inglês, European Technology Platform Nanomedicine;

GAP – do inglês, *GTPases activating proteins*;

GEF – do inglês, *guanine exchange factors*;

GRB2 – do inglês, *Growth-factor-receptor bound protein 2*;

HCT116 - Linha celular tumoral proveniente de um carcinoma do colon humano;

HT29 – Linha celular tumoral proveniente de um adenocarcinoma do colon humano;

IARC - do inglês, International Agency for Research on Cancer;

KRAS – do inglês, *Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*;

MTS - do inglês, *[3-(4,5-dimethyl-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium]*;

p21 - do inglês, *Cyclin-dependent kinase inhibitor 1*;

PBS – do inglês, *Phosphate-Buffered Saline*;

PCI – do inglês, *Phenol-chloroform isoamyl alcohol*;

PCR – do inglês, *Polymerase Chain Reaction*;

PEG – Polietilenoglicol;

PI – Índice de polidispersão;

qPCR – Reação quantitativa em cadeia da polimerase;

RT-qPCR – do inglês, *Real-Time (ou Reverse-Transcription) quantitative PCR*;

SDS - do inglês, *Sodium dodecyl sulfate*;

SOS1 – do inglês, *Son of sevenless homolog 1*;

UV-Vis – Ultravioleta-Visível;

WHO - do inglês, *World Health Organization*;

WT – Tipo selvagem.

Lista de equações

Equação 3.1- Lei de Lambert-Beer.	40
Equação 3.2- Equação para o cálculo do diâmetro das AuNP@citrato, segundo Haiss <i>et al.</i> (2007).	40
Equação 3.3- Equação ΔCt	43
Equação 3.4- Equação $\Delta\Delta Ct$	43
Equação 3.5- Equação para o cálculo da expressão genética relativa.	43
Equação 3.6- Equação para o cálculo da viabilidade celular.	44
Equação 4.1- Equação ΔCt	67
Equação 4.2- Equação $\Delta\Delta Ct$	67
Equação 4.3- Equação para o cálculo da expressão genética relativa.	67

INTRODUÇÃO

1.1. Cancro – Notas Gerais

Estima-se que o número de células humanas presentes no corpo de um homem adulto padrão (entre os 20 e 30 anos de idade, 170 cm, 70 kg) se encontre entre 10^{12} - 10^{14} células humanas¹, das quais, grande parte esteve, está e estará sujeita a processos de divisão e diferenciação celular. Para que um normal funcionamento do organismo seja mantido, é imprescindível a existência de um controlo apertado no que respeita à multiplicação celular. Este, é conseguido através de uma rede de mecanismos complementares que controlam a proliferação e a morte celular^{2,3}.

O termo “cancro” é genericamente utilizado para definir um amplo grupo de doenças. É geralmente caracterizado pelo desenvolvimento de células anormais, em determinado tecido ou órgão, que se começam a dividir de forma descontrolada, crescendo para além dos seus limites usuais e, consequentemente, formando massas de tecido (tumores), os quais poderão invadir partes adjacentes do corpo e/ou espalhar-se para outros órgãos (metástases) (WHO, 2018)^{4,5}. O cancro é, assim, originado a partir de uma desregulação entre a proliferação e a morte celular.

Nas últimas décadas, o cancro, tem vindo a ser encarado como um problema de saúde a nível mundial, sendo atualmente a segunda principal causa de morte no mundo. De acordo com os dados recolhidos pela Agência Internacional de Pesquisa do Cancro (International Agency for Research on Cancer, IARC), só em 2018, surgiram mais 18 milhões de novos casos e aproximadamente 9,6 milhões de mortes devidas ao cancro (IARC, 2018)⁶. Devido ao seu impacto social e económico, assim como pela dimensão populacional afetada, existe uma procura exaustiva, esforços e movimentações de recursos imensos, em prol da obtenção de tratamentos cada vez mais eficazes para esta doença. O impacto económico do cancro é significativo e está em crescimento, tendo o seu custo anual total, em 2010, sido estimado em aproximadamente 981 mil milhões de euros (*1,16 trillion US\$*) (IARC, 2014).

1.1.1. Taxas de incidência no Mundo

De acordo com os dados recolhidos pela Organização Mundial de Saúde (World Health Organization, WHO), os tipos de cancro mais comuns, a nível mundial são: o cancro do pulmão com mais de 2,09 milhões de novos casos (11,6%); seguindo-se o cancro da mama com um pouco menos de 2,09 milhões de novos casos (11,6%); e o cancro colorretal com 1,28 milhões de novos casos (10,2%) apenas em 2018 (Figura 1.1) (IARC, 2018)⁶.

A mesma organização disponibiliza, também, o número estimado de mortes, em 2018, provocadas pelos vários tipos de cancro. A partir destes dados, é possível denotar que os tipos de cancro responsáveis pelo maior número de mortes, apenas em 2018, recaem sobre: o cancro do pulmão responsável por mais de 1,76 milhões de mortes (18,4%); seguindo-se o cancro colorretal com mais de 880 mil mortes (9,2%); o cancro do estômago com mais de 782 mil mortes (8,2%)

e o cancro do fígado, responsável por 781 mil mortes (8,2%). Apesar do cancro da mama ser o segundo tipo de cancro mais incidente, verifica-se, no entanto, que apenas se apresenta como o quinto tipo de cancro mais mortífero com mais de 626 mil mortes (6,6%) (Figura 1.1) (IARC, 2018)⁶.

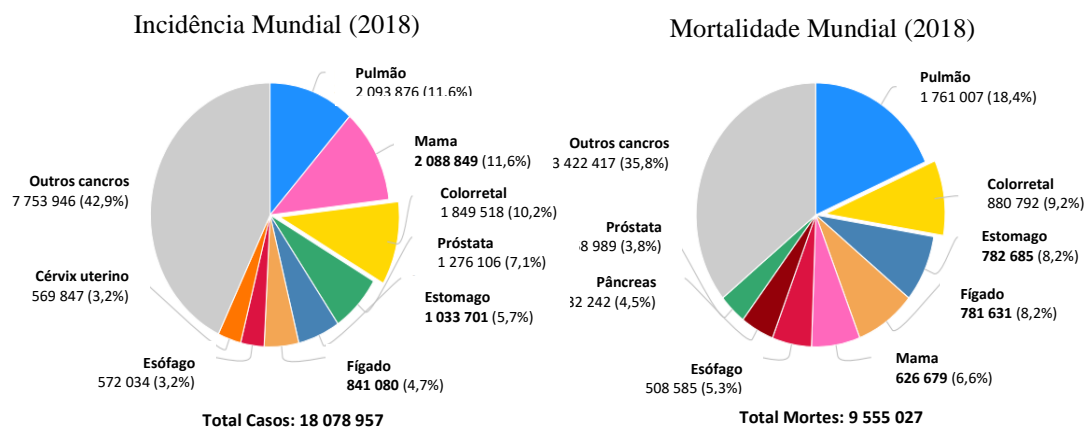


Figura 1.1- Índices de incidência e de mortalidade das vítimas de cancro à escala mundial, em 2018 (Adaptado de Globocan 2018).

A partir da WHO, podemos também observar as diferenças relativamente às incidências e mortalidades dos vários tipos de cancro, em homens e mulheres.

Por exemplo, para o sexo masculino os tipos de cancro mais comuns foram: o cancro do pulmão com de 1,37 milhões de casos (14,5%), o cancro da próstata com 1,28 milhões de casos (13,5%), seguidos do cancro colorretal com 1,03 milhões de casos (10,9%); enquanto que os responsáveis por um maior número de mortes foram: o cancro do pulmão, responsável por 1,18 milhões de mortes (22%), o cancro do fígado, responsável por 548 mil mortes (10,2%), e o cancro do estômago, responsável por 514 mil mortes (9,5%) (Figura 1.2) (IARC, 2018)⁶.

Relativamente ao sexo feminino, o maior número de incidências recaiu sobre: o cancro da mama com 2,09 milhões de casos (24,2%), o cancro colorretal com 823 mil casos (9,5%), e o cancro do pulmão com 725 mil casos (8,4%) em 2018; enquanto que os mais mortais foram o cancro da mama, responsável por 627 mil mortes (15%), o cancro do pulmão, responsável por 576 mil mortes (13,8%), e o cancro colorretal, responsável por 397 mil mortes (9,5%) (Figura 1.2) (IARC, 2018)⁶.

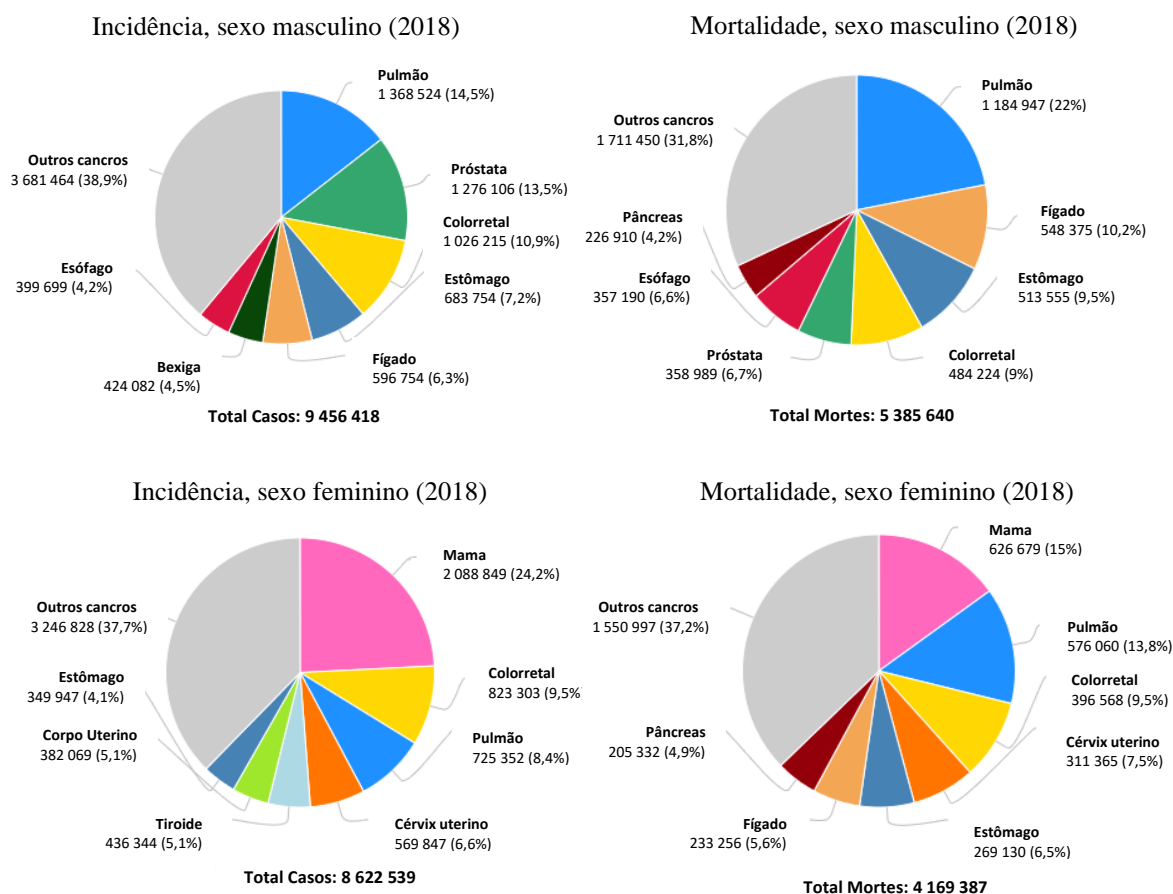


Figura 1.2- Distribuição de casos de incidência e de mortalidade dos vários tipos de cancro, no mundo, em 2018, pelo sexo masculino e feminino (Adaptado de Globocan 2018).

1.1.2. Taxas de incidência na Europa

Ao olharmos os valores obtidos para os mesmos gráficos, mas apenas à escala europeia, começam a notar-se algumas alterações nas ordens dos cânceros mais comuns, e daqueles que mais frequentemente levam os pacientes à morte (Figura 1.3) (IARC, 2018)⁶.

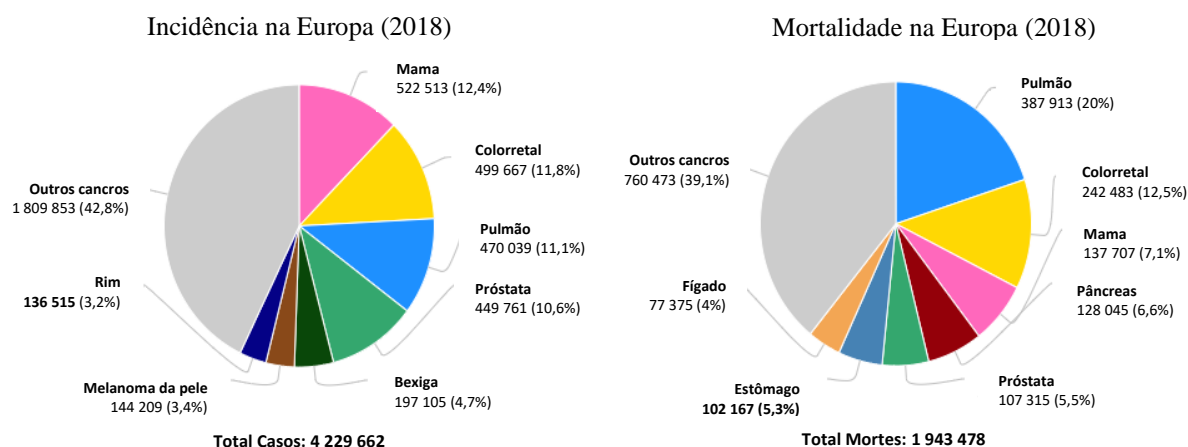


Figura 1.3 - Índices de incidência e de mortalidade das vítimas de cancro, na Europa, em 2018 (Adaptado de Globocan 2018).

De salientar que o cancro da mama é o mais frequente (12,4%), no entanto é apenas o terceiro mais mortal (7,1%). Por outro lado, o cancro colorretal ocupa o lugar seguinte de frequência (11,8%), mas ultrapassa o cancro da mama quando nos referimos à sua mortalidade (12,5%). Para fechar o pódio, o terceiro tipo de cancro mais frequente é o cancro do pulmão (11,1%), mas é este também o mais mortal (20%) entre todos (IARC, 2018)⁶.

Na Europa, para o sexo masculino os tipos de cancro mais comuns foram: o cancro da próstata com 450 mil casos (20%), o cancro do pulmão com 312 mil casos (13,9%), seguido do cancro colorretal com 272 mil casos (12,1%); enquanto que os responsáveis por um maior número de mortes foram: o cancro do pulmão, responsável por 267 mil mortes (24,6%), o cancro colorretal, responsável por 130 mil mortes (11,9%), e o cancro da próstata, responsável por 107 mil mortes (9,9%) (Figura 1.4) (IARC, 2018)⁶. Relativamente ao sexo feminino, o maior número de incidências recaiu sobre: o cancro da mama com 523 mil casos (26,4%), o cancro colorretal com 228 mil casos (11,5%), e o cancro do pulmão com 158 mil casos (8%) em 2018; enquanto que os mais mortais foram o cancro da mama, responsável por 138 mil mortes (16,1%), o cancro do pulmão, responsável por 121 mil mortes (14,1%), e o cancro colorretal, responsável por 113 mil mortes (13,1%) (Figura 1.4) (IARC, 2018)⁶.

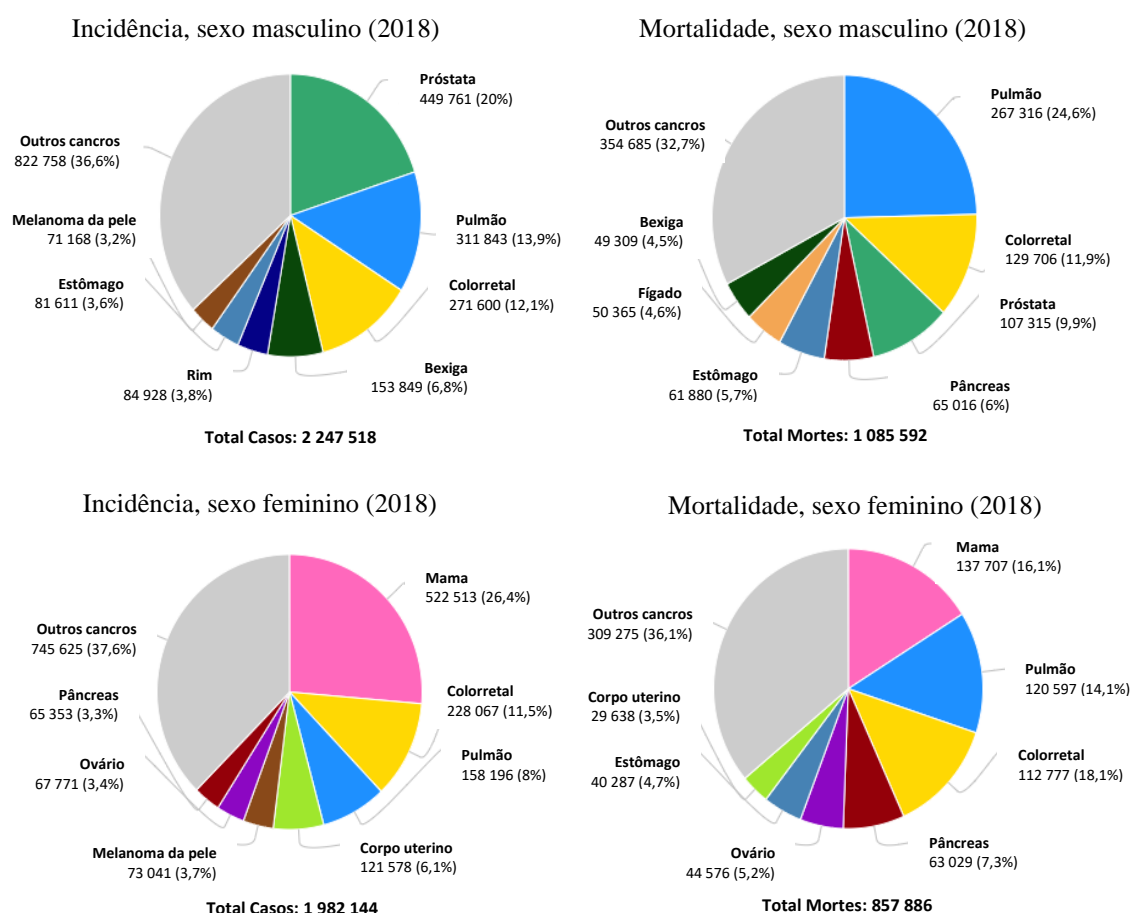


Figura 1.4- Distribuição de casos de incidência e de mortalidade dos vários tipos de cancro, na Europa, em 2018, pelo sexo masculino e feminino (Adaptado de Globocan 2018).

1.1.3. Taxas de incidência em Portugal

Focando agora particularmente no nosso país, Portugal, acentua-se a preocupação dada relativamente ao cancro colorretal (Figura 1.5), pois este ocupa o tipo de cancro em que mais casos foram reportados (17,6%), e o tipo de cancro responsável pelo segundo maior número de mortes (14,7%). Segue-se-lhe o cancro da mama em termos de incidência (12%), no entanto apresenta uma mortalidade mais baixa (6%). O cancro do pulmão, embora seja menos frequente em Portugal que outros cancros (9,1%), é aquele que continua a apresentar o maior número de mortes (16,1%) (GLOBOCAN, 2018)⁷.

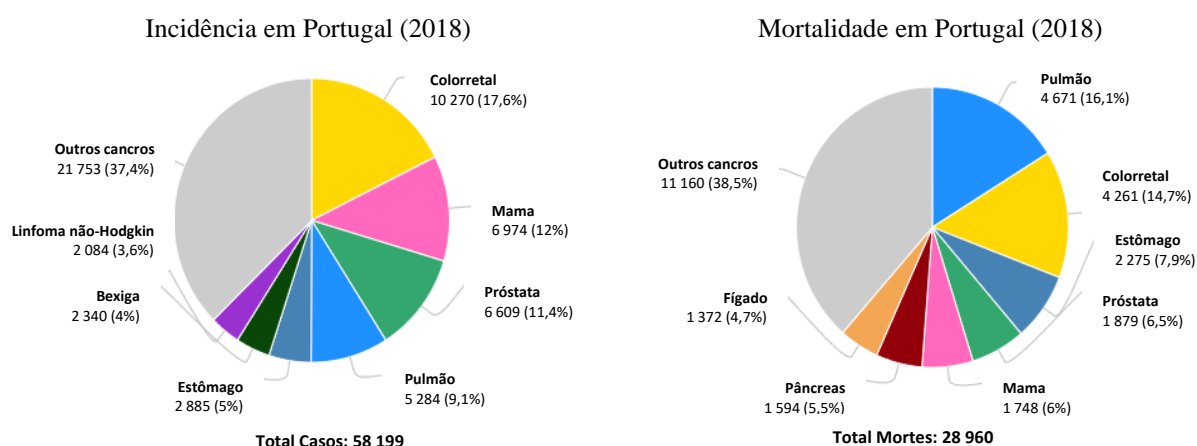


Figura 1.5- Índices de incidência e de mortalidade das vítimas de cancro, em Portugal, em 2018 (Adaptado de Globocan 2018).

Em Portugal, para o sexo masculino os tipos de cancro mais comuns foram: o cancro da próstata (20,4%), o cancro colorretal (18,8%), seguido do cancro do pulmão (12,3%); enquanto que os responsáveis por um maior número de mortes foram: o cancro do pulmão (20,8%), o cancro colorretal (14,2%), e o cancro da próstata (10,7%) (Figura 1.6). Relativamente ao sexo feminino, o maior número de incidências recaiu sobre: o cancro da mama (27,1%), o cancro colorretal (16,2%), e o cancro da tiroide (5,4%) em 2018; enquanto que os mais mortais foram o cancro colorretal (15,5%), o cancro da mama (15,4%), e o cancro do pulmão (9%) (Figura 1.6) (GLOBOCAN, 2018)⁷.

É também importante salientar que as taxas de incidência e de mortalidade não são proporcionais de país para país, nem de continente para continente. Aproximadamente 70% das mortes derivadas ao cancro ocorrem em países com baixos e médios rendimentos, sendo que apenas 1 em cada 5 destes países possui os dados necessários para conduzir políticas de cancro (WHO, 2020).

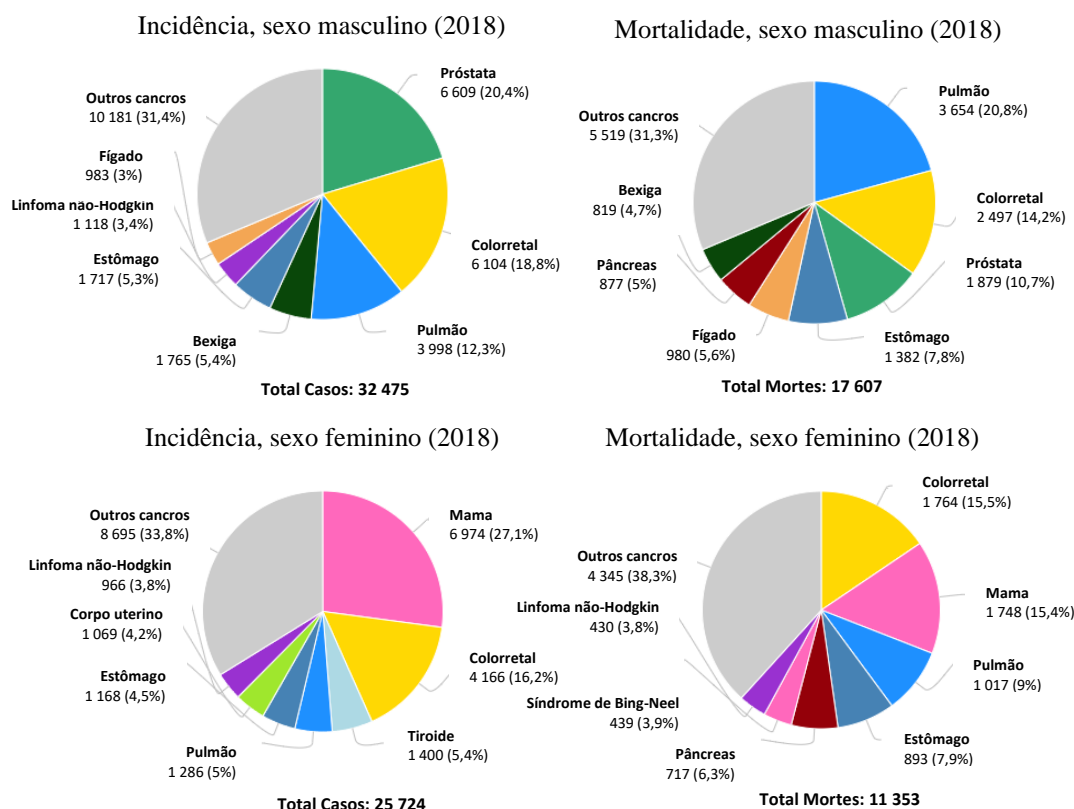


Figura 1.6- Distribuição de casos de incidência e de mortalidade dos vários tipos de cancro, em Portugal, em 2018, pelo sexo masculino e feminino (Adaptado de Globocan 2018).

1.1.4. Agentes causadores de cancro e Fatores de risco

As transformações que levam células normais a tornarem-se células tumorais, resultam da interação entre os fatores genéticos individuais de cada um de nós, e de três categorias de agentes externos. Estes incluem: carcinógenos físicos (ex: radiação ionizante e ultravioleta), carcinógenos químicos (ex: asbestos, componentes do fumo do tabaco, aflatoxina e arsénio) e carcinógenos biológicos (ex: infeções provocadas por determinados vírus, bactérias ou parasitas)^{8,9}. Por “carcinógenos” entende-se qualquer agente físico ou químico, capaz de causar cancro em indivíduos a eles expostos (NHI, <https://www.genome.gov/genetics-glossary/Carcinogen>, consultado a 05-11-2020)¹⁰. Outro fator fundamental associado ao desenvolvimento de cancro deriva do envelhecimento natural a que todos estamos sujeitos. O aumento drástico verificável na incidência de cancro com o aumento da idade resulta da combinação entre a acumulação de riscos para determinados cancros específicos, com a tendência dos mecanismos de reparação celular se tornarem cada vez menos eficazes ao longo dos anos¹¹.

Estima-se, que entre 30-50% dos casos de cancro possam, atualmente, ser prevenidos ao evitar fatores de risco, nomeadamente: índice de massa corporal elevada, pouca ingestão de frutas e vegetais, falta de atividade física, e o uso de álcool e tabaco; e ao implementar estratégias de prevenção, as quais incluem: a prevenção dos fatores de risco anteriormente referidos, a vacinação

contra o HPV e o vírus da hepatite B, a redução a exposição ultravioleta e a radiação ionizante, entre outros (WHO, 2020)¹². Evidências sugerem que o tabaco seja o principal fator de risco a ser evitado, chegando a ser responsável por aproximadamente 22% das mortes relacionadas ao cancro¹³.

1.1.5. Cancro colorretal

Conforme o local onde se inicie o desenvolvimento do cancro, este poderá ser classificado em 5 categorias distintas: carcinomas (pele ou em tecidos que revestem os órgãos internos); sarcomas (ossos, cartilagens, gordura, músculo ou outros tecidos conjuntivos); leucemia (sangue e medula óssea); linfomas (sistema imunológico); e os cancros do sistema nervoso central (cérebro e na medula espinhal) (WebMD, consultado em 05-11-2020)¹⁴⁻¹⁷.

A maior parte dos cancros colorretais pertencem à categoria dos adenocarcinomas¹⁸. Este tipo de cancro caracteriza-se pelo crescimento descontrolado de células glandulares que revestem o interior de um órgão, as quais, em situações normais produzem os fluídos necessários para manter o corpo humano húmido e funcional (WebMD, consultado em 22-10-2020)¹⁹. Inicialmente surgem pequenos pólipos que começam a crescer de forma continuada, os quais podem originar tumores malignos. Estes pólipos podem ser classificados em 5 categorias diferentes: adenomatosos (adenoma tubular), hiperplásicos, serrilhados, adenomas vilosos e inflamatórios; sendo que cada um deles apresenta probabilidades distintas de se poderem vir a tornar cancerígenos. A maioria dos pólipos malignos surge a partir de pólipos adenomatosos, ainda que apenas uma pequena percentagem dos mesmos se torne cancerosa. Este tipo de pólipos representa 70% do total de pólipos testados para cancro. Em contrapartida, os adenomas vilosos apresentam um elevado risco de se virem a tornar cancerosos, ainda que representem apenas 15% do total de pólipos detetados no rastreio do cancro do cólon, devido, em grande parte, ao seu formato. Ao desenvolverem-se, os pólipos assumem uma de duas formas: planos ou pedunculados. Os pólipos planos são mais difíceis de serem detetados, razão pela qual poderão apresentar um número mais elevado relativamente ao esperado. Contrariamente, os pólipos pedunculados, são mais facilmente detetados devido ao seu formato característico. O processo de desenvolvimento de pólipos em cancros do cólon é lento, podendo chegar a demorar alguns anos. Desta forma, se forem feitos exames regulares, e com diagnósticos precisos, os pólipos poderão ser detetados e removidos cirurgicamente antes de crescerem e se transformarem num tumor maligno. O cancro do cólon possui um elevado componente genético, verificando-se que até 15% dos pacientes com cancro colorretal têm familiares com o mesmo tipo de neoplasia²⁰⁻²².

1.2. Carcinogénese e Oncogénese

Por definição, “carcinogénese” é o termo utilizado quando nos referimos ao início de um tumor, enquanto “oncogénese” se refere à manutenção e posterior evolução do mesmo. A carcinogénese é um processo de múltiplas etapas, as quais abrangem desde o momento do estímulo carcinogénico inicial até à manifestação final do cancro²³. No decorrer de experiências sobre a carcinogénese da pele em ratos foram descritos 3 conceitos: iniciação, promoção e progressão; os quais Berenblum, em 1982, considerou serem as 3 etapas da evolução do cancro. Posteriormente, estes conceitos passaram a ser utilizados para outros tecidos e espécies^{24,25}.

Numa primeira fase, um agente carcinogénico provoca uma alteração ao nível do DNA cromossomal. Esta alteração corresponde a uma mutação que inicialmente pode ser reparada ou reproduzida. As células possuem diversos mecanismos biológicos de reparação celular, sendo desta forma possível reparar a lesão incutida. No entanto, o período até à reparação da lesão é um fator essencial, uma vez que, o DNA apenas poderá ser reparado na eventualidade de retenção na fase mitótica, desta forma, prevenindo que a lesão seja reproduzida. A etapa de iniciação começa assim com a impossibilidade de reparação de uma lesão no DNA²³, adquirindo estas células capacidades proliferativas autónomas que poderão permanecer latentes indefinidamente, sem produzir efeitos adversos. Estas células, fenotipicamente indistinguíveis das restantes, não serão reconhecidas pelos sistemas de defesa do organismo. No entanto, quando estimuladas de forma adequada, possuem uma capacidade intrínseca de crescimento autónomo. A segunda etapa, a promoção, diz respeito à parte do processo carcinogénico em que os promotores aumentam o desenvolvimento de um tumor a partir de um fundo de células iniciadas²⁵. A progressão diz respeito ao desenvolvimento das células iniciadas previamente referidas, em populações de células biologicamente malignas. Nesta etapa, as células tumorais apresentam um aumento da sua invasividade, desenvolvem capacidade de metastização, e são verificadas alterações nas suas características bioquímicas, metabólicas e morfológicas²⁵.

1.2.1. Formação de células cancerígenas

O processo carcinogénico envolve alterações em quatro grandes categorias de genes: ativação de oncogenes, inativação de genes supressores de tumor, evasão a genes de indução da apoptose, e genes de reparação de DNA²⁵. Durante o processo de formação de um cancro, cada neoplasia, acumula pelo menos 80 alterações genéticas em genes ligados ao cancro, uma dúzia das quais são consideradas mutações “condutoras” que impulsionam o seu crescimento descontrolado. As células cancerígenas resultam, assim, da acumulação sequencial de mutações genéticas e requer a eliminação de vários mecanismos antiproliferativos ou de indução de morte celular. Desta forma, para que esta transformação ocorra, são necessárias modificações em genes que regulam o crescimento e a diferenciação celular²⁶.

Hanahan e Weinberg descreveram nos seus estudos, quais as propriedades mais importantes das células cancerígenas relativamente à sua capacidade de desenvolver um tumor. Estas incluem: uma capacidade de proliferação independentemente de sinais de crescimento e de ignorar sinais inibidores de crescimento; resistência à morte celular programada; um potencial replicativo ilimitado; a indução da angiogénese (crescimento de vasos sanguíneos a partir de vasos sanguíneos já existentes); e a capacidade de formação de metástases (propagação do tumor para outro local diferente do local de origem)²⁷.

1.2.2. Regulação do ciclo celular

Em células eucarióticas, o ciclo celular é dividido em 4 fases distintas: G0/G1, S, G2 e M, sendo a progressão celular controlada por pontos de controlo - *checkpoints*, os quais impedem as células comprometidas de passar para a fase seguinte (Figura 1.7)²⁸.

Após a divisão celular mitótica (M), as células ou entram indefinidamente numa fase de repouso (G0), ou reentram no ciclo celular. Na primeira etapa do ciclo celular (G1), a fase de crescimento, os organelos das células são duplicados, preparando-se a célula para duplicar o seu material genético. O DNA é duplicado na fase de síntese (S), e a célula entra de seguida numa segunda fase de crescimento (G2). Nesta fase a célula cresce novamente, preparando-se para se dividir em duas células filhas idênticas por mitose (M). Estas novas células podem agora reentrar no ciclo celular ou permanecer na fase G0. O ciclo celular é, desta forma, um ciclo continuo onde as células vão progredindo pelas fases G1, S, G2 e M. No entanto, poderão ocorrer problemas ao longo da progressão das células no ciclo celular, sendo assim importante a existência de *checkpoints*. O primeiro *checkpoint* encontra-se no final da fase G1, o qual serve para garantir que não existem problemas nem no DNA, nem na célula em si. O segundo *checkpoint* ocorre na fase G2, de forma a garantir que as células não apresentam problemas antes de entrarem em mitose. O terceiro *checkpoint* situa-se na fase M²⁹.

A progressão das células através do ciclo celular é fortemente controlada por um grupo de proteínas cinases heterodiméricas, constituídas por uma ciclina, a qual funciona como elemento regulatório, e por uma subunidade catalítica, conhecida como cinase dependente de ciclina (CDK). São várias as combinações de complexos ciclina/CDK, e cada fase do ciclo é caracterizada por um padrão específico de expressão e atividade. Estas proteínas são as impulsionadoras do ciclo celular. No início da fase G1, as CDK4/6 são produzidas pela célula, e quando a ciclina D se liga a elas, provoca uma reação no interior da célula responsável pela separação entre a proteína E2F e a proteína Rb. Quando E2F se encontra liberta, atua como um fator de transcrição, permitindo que esta célula em particular progrida no ciclo celular para a fase S³⁰. No final da fase G1, antes da célula entrar na fase S, a mesma produz ainda uma outra combinação de ciclinas/CDK, a CDK2 e a ciclina E. Na fase S, a célula produzirá as proteínas

CDK1/2 e a ciclina A, e na fase G2 produzirá a CDK1 e ciclina B. A existência destas proteínas permite que as células vão avançando pelas diversas fases do ciclo celular. Se por algum motivo tivermos quantidades baixas de CDKs e de ciclinas, as células não irão avançar para a fase seguinte do ciclo celular. Por outro lado, se as suas quantidades forem demasiado elevadas, teremos células continuamente a entrarem no ciclo celular, resultando num crescimento descontrolado das mesmas. Este é um dos mecanismos do cancro^{23,28}.

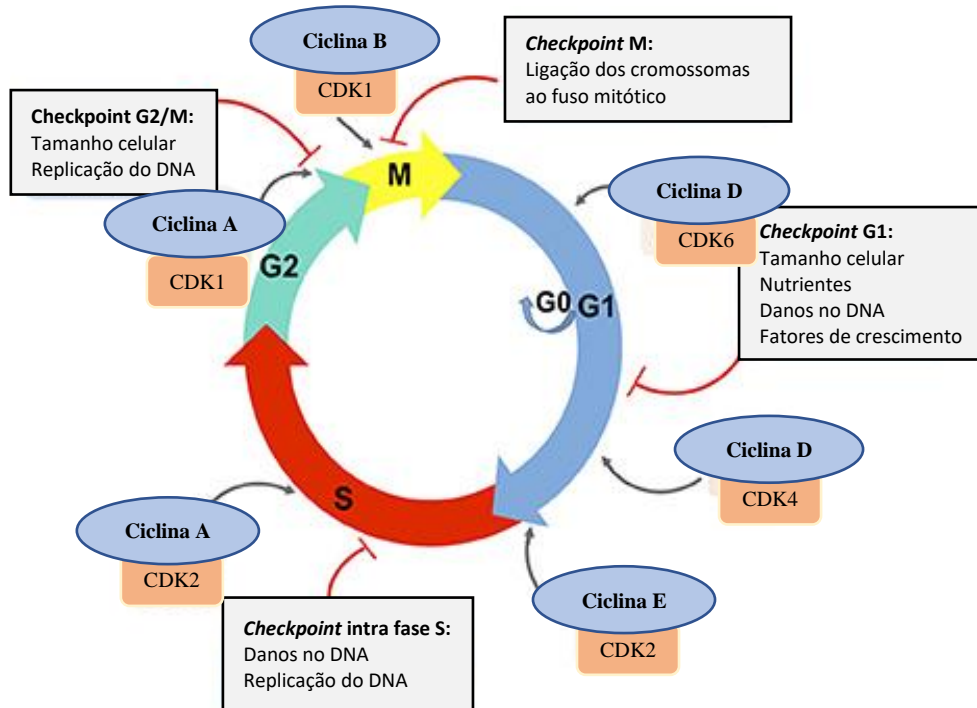


Figura 1.7- Representação esquemática do ciclo celular, incluindo as diversas etapas, os seus *checkpoints*, e as proteínas impulsoras envolvidas em cada etapa (Adaptado de El-Aouar *et al*, 2017) .

O que poderá então provocar um aumento nas quantidades de ciclinas e CDKs dentro das células? É aqui que entram as mutações genéticas. Estas ocorrem dentro do DNA de uma célula, provocando alterações na mesma. Alguns tipos de mutações incluem: mutações pontuais (uma única alteração num nucleótido), amplificação do DNA (quando determinado gene é amplificado várias vezes), rearranjo cromossomal (quando cromossomas se ligam entre eles onde não deveriam), e modificações epigenéticas (metilações e acetilações de genes, o que pode silenciar determinados genes ou torná-los ainda mais ativos). Estas mutações podem fazer com que uma célula normal se torne numa célula cancerígena, e quando uma destas células entra no ciclo celular, obtemos um crescimento celular incontrolável, que consegue ignorar os *checkpoints*. Este crescimento celular descontrolado é essencialmente provocado por duas principais alterações que ocorrem em células cancerígenas: Ativação de oncogenes (*RAS* e *c-MYC*) e inativação de genes supressores de tumores (*p53*, *APC*, *BRCA1/2*)^{23,29}.

1.2.3. Ativação de oncogenes

O genoma humano contém um gene *RAS*, o qual codifica para a proteína *RAS*. Esta é uma proteína intracelular que se encontra ao lado da proteína recetora *EGFR* (do inglês, *epidermal growth factor receptor*). Normalmente, quando uma célula inicia o ciclo celular, existe um fator de crescimento que estimula *EGFR*, o qual ativa a proteína *RAS*. Uma vez ativada, a proteína *RAS* desencadeia uma cascata de fosforilações intracelulares de outras proteínas, as quais no final ativarão um fator de crescimento. Quando este fator de crescimento é ativado, vai até ao DNA “ler” os genes para sintetizar proteínas que permitam à célula crescer, passando da fase G1 para a fase S. Estas proteínas são as *CDK* e *ciclinas* anteriormente referidas. Desta forma, uma mutação em *RAS* levará a um aumento da síntese de proteínas *RAS*, as quais já estavam ativas, e assim teremos esta cascata de fosforilações a acontecer sistematicamente, e teremos sempre a ativação do fator de transcrição, resultando numa produção exagerada das quantidades das proteínas responsáveis pelo crescimento celular (*ciclinas* e *CDKs*)²³.

No caso do gene *c-MYC* normalmente codifica proteínas importantes para o crescimento celular, para a sobrevivência da célula, e para a atividade celular. Uma mutação em *c-MYC* resulta num crescimento celular aumentado, mais atividade celular, e um aumento de sobrevivência celular. Assim, a ativação destes oncogenes vai permitir que a célula ignore os *checkpoints* do ciclo celular, permitindo que a célula cresça descontroladamente²³.

Desde 1980 que os oncogenes têm sido identificados no material genético do tumor em muitas neoplasias humanas. Estes oncogenes encontram-se frequentemente na família *RAS*, sendo verificado que quando ativados, apenas diferem numa única mutação pontual relativamente ao seu proto-oncogene homólogo. No entanto, embora possa ser argumentado que a ativação de proto-oncogenes possa ser um evento necessário na génese de alguns cancros, é improvável que uma única mutação pontual associada a um oncogene ativado seja, por si só, suficiente para o desenvolvimento de todos os cancros²⁵. Desta forma, acredita-se que as células cancerígenas sejam o resultado de um conjunto de diversas mutações, em genes cruciais, que ao comprometerem o seu normal funcionamento, interferem no ciclo celular, e acabam por levar as células a uma proliferação descontrolada. Os proto-oncogenes são responsáveis por um controlo adequado da divisão e do crescimento celular, no entanto, quando sofrem determinadas mutações genéticas tornam-se oncogenes³¹.

1.2.4. Inativação de genes supressores de tumores

Numa situação normal, as células possuem mecanismos que impedem as células anormais de progredirem no ciclo celular. É aqui que entram os genes supressores de tumores. Por exemplo, se a célula ficar retida na fase G2, por ter DNA anormal, será impedida de progredir no ciclo celular²⁸.

Quando uma célula contém DNA danificado, ela produz proteínas p53, as quais podem atuar como fatores de transcrição. Estas proteínas vão “ler” o DNA e fazer proteínas para “prender” a célula (ex: p21). As p21 são proteínas que provocam a detenção celular, pois inibem as proteínas CDK e as ciclinas, os impulsadores do ciclo celular, impedindo assim que a célula progrida no ciclo celular. As p53 vão também produzir proteínas importantes para a reparação celular, e assim, com sorte, quando a célula é “detida” poderá ter o seu DNA reparado. As p53 vão ainda produzir proteínas importantes para a apoptose, pois se a célula não puder ser reparada, terá de morrer. Assim, se uma mutação inativar p53, não serão produzidas proteínas para a detenção celular, nem para a reparação celular, nem para a apoptose, e assim temos esta célula que entra no ciclo celular, consegue ultrapassar os *checkpoints* de paragem, e continuamente cresce e prolifera³².

É também importante referir o mecanismo de “um *hit*, dois *hits*”, relativamente aos oncogenes e genes supressores de tumores. O genoma humano é constituído por duas cópias de todos os genes, portanto, para que uma neoplasia ocorra pela via dos oncogenes apenas uma das duas cópias do gene precisa de mutações de ativação, enquanto pela via dos genes supressores de tumores são necessárias ambas as cópias serem inativadas/sofrer mutação antes que a neoplasia possa ocorrer³³.

1.3. Classificação dos estados de progressão de um cancro

Após o diagnóstico é necessária a realização de exames complementares, de forma a compreender o desenvolvimento e a extensão do cancro. Os exames a realizar podem variar entre exames anatomopatológicos, tomografias computadorizadas, ou ainda biópsias da medula óssea, consoante o tipo de cancro detetado (Onco+, <http://oncomais.pt/cancro/o-que-e-o-cancro/estadios-do-cancro>, consultado em 27-11-2020).

O sistema de classificação mais utilizado para descrever o estado de progressão de um cancro é o sistema TNM do American Joint Committee on Cancer (AJCC): sendo que o “T” se refere ao tamanho do tumor; o “N” à sua disseminação para gânglios linfáticos próximos do local originário do tumor; e o “M” à existência de metástases. Os oncologistas combinam os resultados deste sistema com os de outros fatores específicos para determinar o estado do cancro de cada individuo (Tabela 1.1). A escala possui 4 estádios (do I ao IV) para a maioria dos tipos de cancro, sendo que alguns podem ainda ser classificados com um estágio 0 (ASCO, <https://www.cancer.net/navigating-cancer-care/diagnosing-cancer/stages-cancer>, consultado em 23-10-2020)³⁴⁻³⁶.

Tabela 1.1- Estádios de desenvolvimento do cancro. Significado da escala numérica.

Estádio 0	Descreve o estágio <i>in situ</i> , ou seja, uma fase muito inicial em que o cancro é extremamente localizado e isolado. Estado altamente curável, geralmente com cirurgia de remoção ou radioterapia.
Estádio I	Chamado de cancro em fase inicial, o pequeno tumor ainda não se desenvolveu profundamente nos tecidos mais próximos. Nesta fase, ainda não se espalhou para os gânglios linfáticos nem outras partes do corpo.
Estádio II	Fase em que há uma maior extensão do tumor, o qual cresceu para tecidos próximos. No entanto, ainda não se espalhou para as glândulas linfáticas.
Estádio III	Esta fase é geralmente associada à invasão de glândulas linfáticas. No entanto, o tumor ainda não invadiu outras partes do corpo.
Estádio IV	Fase bastante avançada da doença. Trata-se um tumor com metástases que já se espalhou para outros órgãos para além do órgão primário. Esta fase do cancro apresenta hipóteses de cura extremamente baixas. O tratamento tem como principal objetivo a manutenção de alguma qualidade de vida e não a cura.

Existem, no entanto, algumas exceções relativas à utilização deste sistema. Por exemplo, para classificar tumores cerebrais apenas se utiliza o “T” deste sistema, pois normalmente estes tumores não se espalham para fora do seu local de origem^{37,38}. Da mesma forma, também não é utilizado este sistema para leucemia, linfomas ou mieloma múltiplo, pois não formam tumores sólidos³⁸. Outra exceção passa pela classificação de cancros infantis, em que são utilizados outros sistemas, que variam consoante o tipo de cancro (ASCO, <https://www.cancer.net/navigating-cancer-care/diagnosing-cancer/stages-cancer>, consultado em 28-11-2020)³⁹.

1.4. A família RAS

As proteínas RAS (HRAS, KRAS, NRAS) constituem uma das famílias de proto-oncogenes melhor caracterizadas. Estas GTPases correspondem à família oncogénica que mais frequentemente se encontra mutada no cancro humano, observando-se em até 30% de todos os casos^{40,41}. Dentro desta família, *KRAS* (*Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*) é responsável por ~85% de todas as mutações *RAS*, sendo detetadas em 95% dos casos de cancro pancreático e 50% dos casos de cancro colorretal⁴¹⁻⁴³. De entre os vários oncogenes envolvidos no desenvolvimento de cancro em humanos, é o gene que se encontra mais estudado e melhor caracterizado⁴⁴.

A proteína KRAS diz respeito a uma pequena GTPase, pertencendo a uma superfamília de pequenas GTPases que contém mais de 154 membros. Estão organizadas em 5 subfamílias (RAS, RHO, RAB, ARF e RAN), tendo por base as suas sequências de DNA e a sua função. A proteína

KRAS está incluída na subfamília RAS consistindo em 4 proteínas de 21 kD que diferem nas suas sequências do c-terminal: HRAS, NRAS, KRAS4A e KRAS4B. KRAS4A e KRAS4B são variantes de *splicing* alternativo no c-terminal do gene *KRAS*, sendo KRAS4B a variante mais comum sendo referida na maioria da literatura como KRAS^{45,46}.

Todas as proteínas RAS alternam o seu estado entre ativo, quando ligadas a uma guanina trifosfato (GTP), ou inativo quando ligadas a uma guanina difosfato (GDP)⁴⁴. Esta reação é aumentada pelos fatores de troca de nucleótidos de guanina (GEFs), os quais têm como função abrir o local de ligação das GTP^{44,46,47}. Contrariamente, as proteínas ativadoras de GTPases (GAPs) são responsáveis pela inativação de KRAS ao hidrolisarem o GTP.^{44,48}

A proteína KRAS é constituída por 2 domínios: um domínio conservado de ligação a GDP/GTP que contem 2 regiões flexíveis, fornecendo uma plataforma funcional de interação com reguladores e efetores⁴⁹⁻⁵¹; e um c-terminal altamente variável, o qual corresponde a uma zona para modificações pós-tradução, responsável pela ancoragem da proteína à membrana plasmática^{44,52-54}.

1.4.1. Influência de KRAS nas vias metabólicas

Aquando a ativação de EGFR, a montante de KRAS, determinadas proteínas adaptadoras, por exemplo, proteínas que contêm um grupo funcional -SH2 (*SH-2 containing protein*, SHC), e a proteína 2 ligada ao recetor do fator de crescimento (GRB2) recrutam GEFs específicos, como por exemplo o SOS1 para a membrana celular. Este SOS1 promove a troca de GDP por GTP

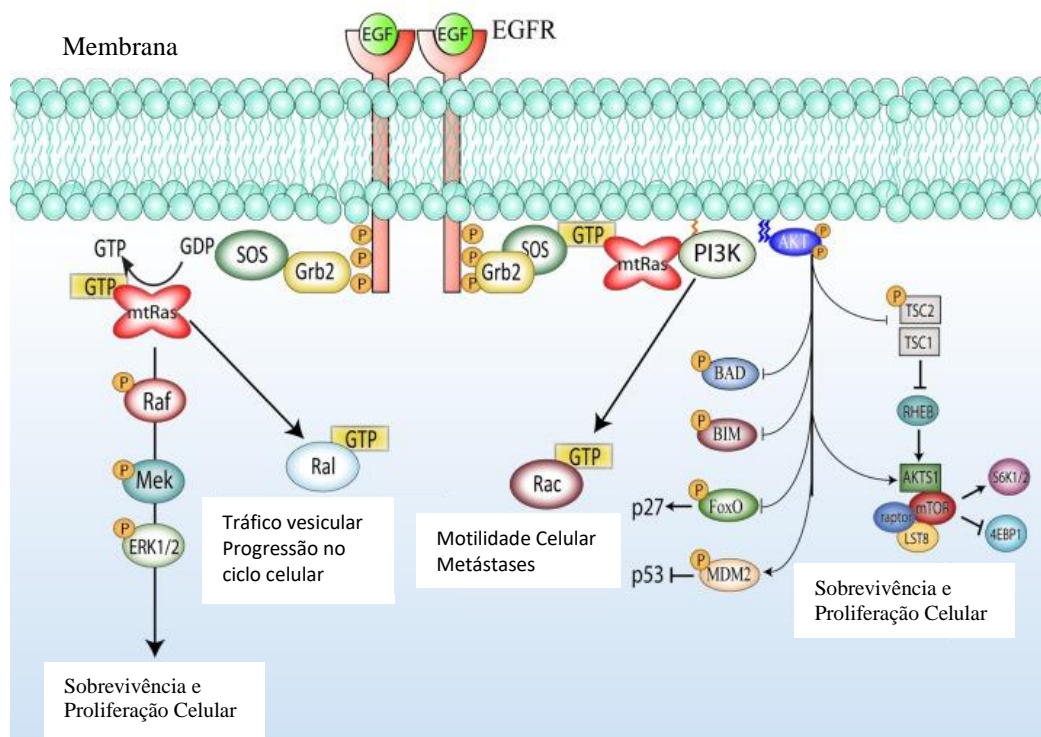


Figura 1.8– Vias de sinalização celular influenciadas pela ativação de KRAS (Adaptada de Brand, T. M., & Wheeler, D. L., 2012).

ativando assim KRAS. No seu estado ativo, KRAS, transduz o sinal a diversas proteínas efetoras a jusante, ativando assim múltiplas vias sinalizadoras e, desta forma, conseguindo controlar/regular vários processos celulares que incluem: a sobrevivência, o crescimento, a proliferação, a diferenciação, e a apoptose celular⁴⁴.

A ativação do KRAS leva a uma mudança conformacional na RAF quinase, a qual acabará por levar à ativação e ao transporte nuclear de MAPK. A forma ativa de KRAS pode também recrutar diretamente PI3K para a superfície celular, levando à ativação da serina/treonina quinase AKT, resultando na ativação adicional de mTOR e inibição de vários sinais pró-apoptóticos^{46,55}. Adicionalmente, KRAS pode recrutar várias proteínas GEF responsáveis pela ativação das pequenas GTPases RAL e RAC⁴⁵. A partir da ativação destas proteínas intracelulares, o KRAS é capaz de iniciar um vasto programa de expressão oncogénica, resultando na proliferação, sobrevivência e migração celular⁵⁵.

1.4.2. Mutações em KRAS

O KRAS mutado tem sido considerado um alvo intratável até aos dias de hoje, não existindo, até à data, nenhum tratamento que consiga bloquear a sua atividade eficazmente⁵⁶⁻⁵⁸. Quando KRAS se encontra mutado obtém uma conformação que lhe permite estar constitutivamente ligado ao GTP, não o conseguindo hidrolisar. Esta situação deve-se a uma alteração na zona de ligação GAP. Neste caso, os sinais que emanam do KRAS são hiperativados e o EGFR perde toda a sua capacidade de regular a ativação do mesmo, sendo esta a razão pela qual os inibidores do EGFR se tornarem ineficazes⁴⁶.



Figura 1.9 - Frequência das mutações em KRAS nos vários tipos de cancro humano de acordo com o Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (Adaptado de Stolze, B *et al.*, 2015).

De acordo com informações provenientes do Catalogue of Somatic Mutations in Cancer (COSMIC, <http://cancer.sanger.ac.uk/cancergenome/projects/cosmic>, consultado em 11-12-

2020), as mutações mais comuns encontradas em *KRAS* correspondem a mutações *missense* que originam substituições nos codões 12 e 13, situados no exão 2 (Figura 1.9)⁵⁹⁻⁶¹. O aminoácido que se encontra mais comumente substituído em ambos os codões é o resíduo de glicina, o qual é trocado por um resíduo de aspartato^{59,62}. Mutações nos codões 61, 146 e 154 têm também sido documentadas, embora sejam mais raras de se encontrar. Todas estas mutações promovem o potencial oncogénico de *KRAS* ao (1) desativar a atividade intrínseca da GTPase de *KRAS* e, (2) ao prevenir que as GAP se associem com *KRAS*⁵⁹. Assim, o *KRAS* mutado não pode hidrolisar GTP em GDP e, portanto, não pode ser inativado, resultando em aumentos independentes de EGFR na ativação de ambas as vias PI3K/AKT e MAPK (Figura 1.8)⁴⁶.

1.5. Terapia

Consoante o tipo de cancro, o seu estado de desenvolvimento, e a saúde geral apresentada pelo paciente, a forma de tratamento irá variar. Algumas das várias opções de tratamento incluem: a cirurgia, a radioterapia, a quimioterapia, e a terapia genética^{17,63,64}.

A cirurgia consiste na remoção direta do tumor. Enquanto que a radioterapia se baseia na utilização de raios-X de forma a matar as células cancerígenas, a quimioterapia recorre ao uso de químicos para o mesmo fim. Atualmente acredita-se que a terapia combinada tem maior probabilidade de sucesso, uma vez que diminui a possibilidade de resistência aos tratamentos⁶³. A terapia genética aparece como uma forma de tratamento promissora, envolvendo a utilização de genes diretamente nas células dos pacientes⁶⁵⁻⁶⁷. Em qualquer uma das possibilidades de tratamento, o objetivo passa pela eliminação do maior número possível de células cancerígenas, evitando causar danos às células normais que as rodeiam^{17,68}. É também importante salientar que o mesmo tipo de cancro é diferente para cada indivíduo, estando a ser descobertos/reportados subtipos dentro de um mesmo tipo de cancro, requerendo abordagens de tratamento diferentes⁶⁹.

No futuro, o tratamento do cancro consistirá no fornecimento aos pacientes de opções cada vez mais personalizadas, por exemplo, tendo em conta alterações genéticas específicas (Cancer Treatment Centers of America, <https://www.cancercenter.com/what-is-cancer>, consultado em 09-10-2020)^{70,71}.

1.5.1. Cirurgia

A cirurgia é utilizada como forma de diagnóstico, para identificar o estado de desenvolvimento do cancro e tratá-lo, assim como aos sintomas pelo mesmo provocados. No entanto, esta opção de tratamento nem sempre pode ser realizada, consoante o tipo de cancro, o seu tamanho, localização, grau e estado de desenvolvimento. Outros fatores tidos em conta passam pela saúde geral apresentada pelo paciente (idade, aptidão física e a existência de outras patologias). Este tipo de tratamento é comumente utilizado em conjugação com outras opções,

sejam elas a quimioterapia, a radioterapia, ou até mesmo a terapia hormonal, e não de forma individual. Os tratamentos referidos podem ser administrados antes da prática cirúrgica (neoadjuvante) ou após a mesma (adjuvante) de forma a prevenir o crescimento, a disseminação ou a recorrência do cancro. Uma outra opção passa ainda pela sua utilização como tratamento paliativo (remoção de obstruções nos pulmões e garganta, ou de tumores que estejam a causar algum tipo de dor ou desconforto ao paciente). Alguns dos efeitos secundários associados a esta forma de tratamento incluem: infeção, inchaço, fadiga, dor, linfedema ou náusea (Cancer Treatment Centers of America, <https://www.cancercenter.com/treatment-options/surgery>, consultado em 28-11-2020)^{17,63}.

1.5.2. Radioterapia

A radioterapia baseia-se na utilização de energia direcionada (raios-X, substâncias radioativas) de forma a destruir células cancerígenas, reduzir tumores e/ou aliviar sintomas ao cancro associados. Pode ser utilizada com diferentes objetivos, dependendo da estratégia definida: como tratamento primário, destruindo as células cancerígenas; ou em combinação com outros tipos de tratamento, interrompendo o crescimento das mesmas. Poderá ser realizada antes de outro tratamento de forma a reduzir o tumor; após outro tratamento de forma a parar o crescimento de quaisquer células cancerígenas remanescentes; ou para aliviar sintomas de cancros em fases mais avançadas. O tipo de radioterapia que o paciente recebe irá depender de uma variedade de fatores, nomeadamente: o tipo de cancro, tamanho e localização. A radioterapia pode ser administrada externamente ou internamente, sendo que os métodos de administração utilizados incluem: radioterapia de feixe externo, radioterapia interna, ou radioterapia sistémica. Os tratamentos com radioterapia podem, no entanto, provocar determinados efeitos secundários aos pacientes, sendo os mais comuns: reações na pele, fadiga e linfedemas (Cancer Treatment Centers of America, <https://www.cancercenter.com/treatment-options/radiation-therapy>, consultado em 28-11-2020)^{17,63,72}.

1.5.3. Quimioterapia

A quimioterapia consiste na utilização de fármacos anticancerígenos, direcionados a células tumorais devido ao seu rápido crescimento. A quimioterapia é dividida em dois grupos: quimioterapia sistémica e quimioterapia regional. Na primeira, os fármacos chegam às células cancerígenas através da corrente sanguínea, enquanto que na última, são direcionados a uma área específica do corpo. Pode ser utilizada com diferentes objetivos, dependendo da estratégia definida: como tratamento primário para destruir células cancerígenas; antes de outro tratamento para reduzir um tumor; após outro tratamento para destruir as células cancerígenas restantes; ou para aliviar os sintomas em fases mais avançadas. A sua administração pode ser feita por: via oral

(comprimido ou líquido); Infusão (diretamente numa veia por gotejamento intravenoso); Injeção (através de uma agulha injetada numa veia, músculo ou sob a pele); na forma de creme; Intratecal (diretamente no sistema nervoso central); ou Intraperitoneal (diretamente na cavidade abdominal); dependendo de uma variedade de fatores, incluindo: o medicamento prescrito; o cancro a ser tratado; o estágio da doença; a saúde do paciente; o histórico de saúde do paciente, incluindo tratamentos de cânceros anteriores; ou a preferência pessoal do paciente. Os efeitos secundários da quimioterapia incluem: fadiga, perda de apetite, mucosite ou feridas na boca, anemia, constipação, neuropatia, perda de memória ou dificuldade de concentração, febre. Os fármacos utilizados na quimioterapia são poderosos, podendo também causar efeitos colaterais noutras pessoas com as quais entrem em contato, por exemplo através de fluidos corporais (muco, suor, lágrimas, sêmen, urina, vômito ou fezes)^{17,63,73}.

Tal como anteriormente referido, a quimioterapia atua atacando as células cancerígenas pois estas crescem rapidamente no corpo. No entanto, existem também no corpo humano outras células de crescimento rápido (células que se encontram na medula óssea, no trato digestivo e nos folículos capilares), as quais poderão também ser atacadas e mortas pelos fármacos utilizados no tratamento. Esta é a razão pela qual um sistema imunitário suprimido, vômitos, diarreia e queda de cabelo são efeitos colaterais que comumente se verificam em pacientes submetidos à quimioterapia (Cancer Treatment Centers of America, <https://www.cancercenter.com/treatment-options/chemotherapy>, consultado em 28-11-2020)^{17,63,73,74}.

1.5.4. Terapia Genética

A terapia genética consiste na utilização de genes no tratamento ou prevenção de doenças. Várias abordagens têm sido testadas, desde a substituição do gene mutado por uma cópia saudável, à inativação do gene mutado, ou até mesmo à introdução de um novo gene no paciente (Medlineplus, <https://medlineplus.gov/genetics/understanding/therapy/genetherapy/>, consultado em 28-11-2020)^{65,66}. Na terapia genética podem ser utilizadas ferramentas de edição genómica (ex: CRISPR/Cas9) ou RNA (ex: oligonucleotídeos *antisense*, RNA de interferência). Ambas as estratégias pretendem repor uma funcionalidade perdida ou desativar um gene disfuncional, no entanto, contrariamente às terapias direcionadas ao DNA, as quais geralmente obtêm efeitos permanentes nas células, as estratégias envolvendo RNA são transitórias. A entrega de material genético às células é realizada com recurso a vetores de transfeção (lipossomas, partículas virais, proteínas recombinantes ou nanopartículas inorgânicas) de forma a manter a estabilidade do material genético transportado. Esta entrega corresponde ao principal desafio que se coloca na implementação desta técnica⁷⁵⁻⁷⁷. Outra das possibilidades prende-se com a utilização de vírus para o seu transporte, sendo que estes apresentam limitações de carga e podem desencadear uma resposta imunitária do organismo⁷⁸.

Especificamente, a utilização de oligonucleotídeos *antisense* de cadeia simples (ASOs) consiste na construção de oligonucleotídeos sintéticos vetorizados em células, complementares a um mRNA-alvo específico. A enzima RNase H cliva a cadeia de RNA dos híbridos DNA-RNA, diminuindo a sua quantidade e, conseqüentemente, a quantidade de proteínas que irão ser traduzidas. Os ASOs podem ainda bloquear a expressão do gene, bloqueando estericamente o ribossoma para se ancorar ao RNA. No caso da interferência por RNA, um pequeno RNA de cadeia dupla é vetorizado dentro das células visando uma sequência específica de mRNA. Em seguida, o complexo de silenciamento induzido pelo RNA perde uma das cadeias, e a cadeia restante (a cadeia guia) liga-se ao RNA complementar. Este processo é mediado pelo complexo de silenciamento induzido por RNA que, em última análise, cliva o RNA alvo. Um dos principais desafios nos métodos de silenciamento de genes é a instabilidade demonstrada pelos oligonucleotídeos quando se encontram dentro das células. Assim, de forma a aumentar a sua estabilidade, são utilizados ácidos nucleicos modificados (ex: grupo tiol) ou materiais nanotecnológicos^{79,80}.

Esta técnica, ainda que experimental, tem demonstrado resultados promissores. Futuramente poderá substituir a utilização de fármacos ou a cirurgia, no entanto ainda envolve riscos, continuando a ser objeto de estudo e a ser testada em doenças para as quais não existem outras possibilidades de tratamento (Medlineplus, <https://medlineplus.gov/genetics/understanding/therapy/genetherapy/>, consultado em 28-11-2020)⁷⁵.

1.6. Resistência do cancro ao tratamento

As formas de tratamento do cancro mais utilizadas recaem sobre a conjugação entre a cirurgia, a quimioterapia e/ou a radioterapia. Ainda que inicialmente se mostrem suscetíveis ao tratamento, nos últimos anos têm sido reportados casos em que se verifica a aquisição de resistência dos tumores ao tratamento realizado, causando o insucesso do mesmo^{63,81}. Alguns dos principais mecanismos que estão na génese da aquisição de resistência aos fármacos são: a alteração do metabolismo do fármaco, a alteração do alvo do fármaco, o aumento do efluxo do fármaco, a diminuição da captação do fármaco, o aumento da reparação de DNA danificado, e um aumento de resistência à apoptose⁸²⁻⁸⁴. Por exemplo, as células conseguem alterar o alvo do fármaco de forma a reduzir a eficácia do medicamento. A aquisição de mutações em genes da família EGFR e na sinalização a jusante (RAS, SRC, RAF e MEK), os quais geralmente se encontram sobre-expressos em muitos tumores, impedem o reconhecimento dos fármacos, comprometendo a terapia⁸⁵. Esta resistência torna indispensável o desenvolvimento de novas estratégias para superar estes problemas. Aqui, a terapia genética revela-se como uma forte

alternativa aos tratamentos convencionais uma vez que atua ao nível molecular, por exemplo: através de silenciamentos genéticos, correção de mutações, entre outros⁸¹.

A caracterização do perfil genético dos tumores ganha a sua importância, podendo ter implicações no tratamento delineado. A resistência primária à terapia com inibidores de *EGFR* foi encontrada em pacientes com alterações em genes específicos. A resistência à terapia com gefitinib e erlotinib é descrita em pacientes com mutações pontuais em *EGFR* (T790), *BRAF*, *PIK3CA* ou regulação positiva em *MET*, *HER2* ou perda de *PTEN*⁸⁶. A resistência aos inibidores de *ALK* ocorre devido à regulação positiva ou mutações em *ALK* (L1196M), ou ativação de *EGFR* ou *KRAS*, que contornam a inibição induzida por crizotinib⁸⁷. Os inibidores de segunda geração afatinib e ceritinib são aprovados pela FDA e prometem tratamento para pacientes que não respondem mais aos inibidores de tirosina quinase de primeira geração para *EGFR* ou *ALK*.

Existem evidências de que a presença de mutações em *KRAS* em câncros do pulmão e do cólon está associada à falta de resposta aos inibidores de *EGFR*⁸⁸. Tanto cetuximab como panitumumab são ativos em câncros colorretais em que se verificam *KRAS* WT. Estes anticorpos monoclonais inibem a ligação dos ligantes de EGF e TGF *alfa* ao EGFR, resultando na inibição da via de sinalização RAS. No entanto, não é observável qualquer benefício clínico para as terapias com panitumumab e com cetuximab em pacientes cujo cancro do cólon apresenta mutações em *KRAS*. Num estudo com 427 doentes, foram detetadas mutações em *KRAS* no cancro colorretal metastático de 43% dos doentes, nenhum dos quais respondeu ao tratamento com panitumumab (taxa de resposta 0%). Da mesma forma, num estudo do L'Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, nenhum dos pacientes com carcinoma colorretal que apresentava mutação em *KRAS* teve resposta à utilização de cetuximab. Este é um exemplo de como a informação sobre uma única mutação presente num oncogene pode influenciar diretamente a decisão do tratamento, pois, de acordo com as informações obtidas nos estudos anteriormente descritos, através da análise prévia ao genoma do paciente, o oncologista saberá de antemão que tanto cetuximab como panitumumab serão eficazes apenas no caso dos pacientes apresentarem um *KRAS* WT, não devendo administrar estes tratamentos se for verificada a existência de uma mutação em *KRAS*. Este é um bom exemplo da prática de medicina personalizada que tem estado a ser implementada^{89,90}.

1.7. Nanomedicina

A nanomedicina é a aplicação médica da nanotecnologia⁹¹ de forma a alcançar inovação na área da saúde (ETPN, <https://etp-nanomedicine.eu/about-nanomedicine/what-is-nanomedicine/>, consultado em 02-11-2020)⁹². A nanomedicina tira partido das propriedades de superfície intrínsecas que têm sido verificadas por determinados materiais, à nano-escala (10^{-9} m, entre 1 e 100 nm), diferindo das propriedades físicas, químicas e biológicas demonstradas pelos mesmos materiais, numa escala maior⁹³⁻⁹⁶. Uma vez que a escala nanométrica corresponde àquela a que ocorrem muitos dos mecanismos biológicos no corpo humano, acaba por permitir que os nanomateriais ultrapassem as barreiras naturais do nosso organismo, consigam aceder a novos locais de entrega, e que interajam com o DNA ou com pequenas proteínas⁹⁶. O revestimento das partículas e a funcionalização das suas superfícies são extremamente comuns para aumentar a biocompatibilidade da partícula e o seu tempo de circulação no sangue, bem como para garantir uma ligação altamente seletiva para com o alvo desejado^{93-95,97,98}.

Existe uma grande variedade de NPs em estudo, incluindo: lipossomas, polímeros, dendrímeros, nanopartículas de carbono, metálicas (magnéticas, de ouro, prata, óxido de ferro) e *quantum dots*^{97,99}. A possibilidade de trabalhar com partículas destas dimensões oferece grandes perspetivas para o futuro da medicina nas mais variadas formas. Permite aos médicos a possibilidade de deteção precoce de doenças, um aumento da precisão do seu diagnóstico, resultando assim numa obtenção e entrega de informação mais rápida e a um rácio custo-eficiência melhorado. A maioria dos produtos de nanomedicina que já se encontram disponíveis correspondem a sistemas de entrega de fármacos, onde nanopartículas os transportam e entregam, mais eficientemente, a partes específicas do corpo (ETPN, <https://etp-nanomedicine.eu/about-nanomedicine/what-is-nanomedicine/>, consultado em 28-11-2020)⁹².

Atualmente, existem já centenas de produtos em testes clínicos, cobrindo as principais patologias (cardiovasculares, neurodegenerativas, músculo-esqueléticas e inflamatórias), contando, a nanomedicina, com cerca de 80 produtos comercializados nas diferentes áreas da saúde. Tal como para qualquer tecnologia inovadora, os riscos também deverão ser avaliados. A segurança dos produtos da nanomedicina é regulamentada e devem seguir uma caracterização completa, uma avaliação de toxicidade e ensaios clínicos em vários estágios. É também importante examinar antecipadamente, com cuidado e responsabilidade, todos os possíveis efeitos secundários, tanto para os seres humanos como para o meio ambiente. Devem também ser tidas em conta preocupações éticas e de aceitação social (ETPN, <https://etp-nanomedicine.eu/about-nanomedicine/what-is-nanomedicine/>, consultado em 28-11-2020)⁹².

Tabela 1.2 - Tipos de NPs usadas como vetores de entrega na terapia do cancro (Adaptado de Ferreira, D *et al.*, 2020).

Tipos de NPs	Caraterísticas	Aplicações	Limitações
Dendrimeros	Pequenas NPs poliméricas ramificadas (1-15 nm); Elevada solubilidade em água; Elevada capacidade de carga.	Vetor de entrega a células cancerígenas e tecidos danificados.	Síntese demorada; Problemas de toxicidade na incorporação e libertação de fármacos.
Lipossomas	Nanoestruturas feitas de moléculas anfifílicas (polímeros, lípidos) com boa compatibilidade e captação celular.	Entrega de carga hidrofílica ou hidrofóbica, consoante a constituição lipídica.	Baixa estabilidade, rápida degradação e eliminação. Pode desencadear oxidação lipídica a longo prazo.
NP poliméricas	Naturais ou sintéticas. Biocompatíveis e biodegradáveis.	Libertação de fármacos controlada, e proteção dos mesmos.	Baixa eficiência de transfeção. Alguma citotoxicidade.
NP de carbono	Pontos de carbono, nanotubos de grafeno, óxidos e de carbono. Propriedades óticas e mecânicas únicas.	Aplicações de entrega de fármacos e de imagem.	Citotoxicidade.
Quantum dots	Nanossondas luminescentes que apresentam elevada fotoestabilidade (sem fotodegradação).	Imagem, deteção e direcionamento.	Elevada toxicidade.
NP de ouro	Núcleo metálico. Propriedades óticas e físico-químicas únicas.	Etiquetagem. Poderão vir a ser utilizadas como ferramentas de diagnóstico.	Citotoxicidade, biodistribuição, tempo de retenção e de resposta fisiológica.
NP magnéticas	Atuam com um campo magnético externo.	Imagem.	Citotoxicidade.

1.7.1. Nanopartículas de ouro

A oncologia tem demonstrado, recentemente, um aumento de interesse em terapias direcionadas. Esta situação tem colocado as AuNPs entre os principais candidatos para a formação e desenvolvimento de sistemas de entrega direcionada (de fármacos, entre outras), diretamente nas células cancerígenas. O interesse deve-se, particularmente, às propriedades físico-químicas apresentadas pelas mesmas, incluindo: as suas propriedades óticas únicas, biocompatibilidade relativamente alta, e facilidade de conjugação com outras biomoléculas¹⁰⁰⁻¹⁰⁶. Os estudos com AuNPs, compreendem uma variação de diâmetro que vão desde pequenos aglomerados de átomos com 2-5 nm até partículas de 100 nm, cada um deles apresentando propriedades intrínsecas distintas. As AuNPs podem ainda apresentar as mais variadas formas: esferas, estrelas, conchas, bastões, etc^{99,107,108}. A panóplia de combinações entre tamanhos e formas podem servir a diferentes propósitos, aproveitando as propriedades óticas de cada NP, capacidade fototérmica, potencial de biofuncionalização e toxicidade^{109,110}.

A existência de uma superfície de ouro, apresenta uma grande afinidade para com determinados grupos funcionais, nomeadamente: grupos tiol, amins e grupos fosfato. Desta forma, o desenvolvimento de várias ferramentas de funcionalização de superfície, permite ainda que as AuNP possam ser cobertas com praticamente qualquer tipo de biomolécula (fragmentos de imagem: fluoróforos, supressores, repórteres; moléculas de direcionamento: anticorpos, peptídeos, açúcares; moléculas estabilizadoras: PEG; agentes terapêuticos: oligonucleotídeos). Os sistemas baseados em AuNPs apresentam assim, uma grande variedade de opções no combate ao cancro, desde a superação de limitações, à minimização de efeitos secundários, e ainda na superação da aquisição de resistência a fármacos¹¹¹.

Tabela 1.3 - Tipos de AuNPs mais comumente utilizados na terapia do cancro (Adaptado de Ferreira D. *et al.*, 2020).

AuNPs	Caraterísticas	Vantagens	Limitações	Aplicações
AuNRs	Alongados. Comprimento de onda plasmónico longitudinal com dependência quase linear.	Propriedades ajustáveis.	Baixa capacidade de carga. Baixo controlo sobre a distribuição de tamanhos.	Ressonância ótica ajustável no NIR para aplicações <i>in vivo</i> .
AuNCus	Oco, com paredes ultrafinas e porosas. Fáceis de sintetizar.	Tamanhos ajustáveis.	Poucos dados acerca da sua toxicidade, biodistribuição e resposta fisiológica.	Teranóstico. Interiores ocas permitem encapsulação. Paredes porosas facilitam libertação do fármaco.
AuNShs	Esféricas.	Melhorada biodisponibilidade <i>in vivo</i> e libertação controlada do fármaco.	Falta de eficácia de direcionamento. Rastreamento e monitorização <i>in vivo</i> limitados.	Entrega de fármacos controlada via irradiação (NIR).
AuNSs	Esféricas sólidas.	Fácil funcionalização. Captação celular aumentada.	Propenso a agregação. Várias rotas de captação celular tornam o controlo difícil.	Versáteis para fototermia e terapia combinada.

OBJETIVOS

2. Objetivos

Um interesse crescente tem sido verificado na procura pelo desenvolvimento de fármacos direcionados ao gene *KRAS*, o oncogene mais frequentemente mutado no cancro. Mutações neste gene levam à sobrevivência celular, e a uma proliferação descontrolada das células tumorais, tornando-o um dos principais genes em estudo a nível mundial. As dificuldades sentidas têm-se prendido principalmente com (i) a sua alta taxa de mutabilidade, dificultando a utilização de estratégias sequência-específicas ou que dependam de uma determinada conformação proteica; (ii) a sua participação em diversas vias metabólicas, sendo a sua sub-expressão compensada numa das outras vias que integra; (iii) o facto de determinadas mutações em *KRAS* (codões: 12, 13 e 61) transformarem a sua atividade de GTPase numa conformação constitutivamente ativa, induzindo um ganho de função.

Os sistemas à nanoescala têm demonstrado um elevado potencial de vetorização de modalidades de *gene therapy* (RNAi, siRNA, ASOs, etc) tanto devido às propriedades intrínsecas dos nanossistemas como pela possibilidade de transporte de carga e *targeting* celular dos nanoconjugados. O laboratório onde o presente trabalho foi realizado, foi pioneiro no uso de estruturas ssDNA em *hairpin* vetorizadas via AuNPs para silenciar vias metabólicas mediadas por RNA dentro de células. Este sistema tem demonstrado resultados promissores na redução de expressão genética envolvendo determinados genes responsáveis pelo desenvolvimento e pela proliferação de tumores, nomeadamente em *BCR-ABL1*, *c-MYC* e *BCL-2*. A avaliação da capacidade de silenciamento de *KRAS* e o seu impacto na viabilidade de células tumorais, só ou em combinação com as terapêuticas tradicionais e/ou de novos compostos de síntese, são passos fundamentais para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

Desta forma, pretende-se com este projeto silenciar *KRAS*, utilizando nanopartículas de ouro funcionalizadas com ssDNA específicos, tendo em conta as sequências alélicas presentes nas linhagens celulares tumorais utilizadas. Esta abordagem visa enaltecer o tratamento personalizado tendo em atenção as mutações específicas que o paciente apresente.

MATERIAIS E MÉTODOS

3. Materiais e Métodos

3.1. Materiais

3.1.1. Lista de reagentes

Tabela 3.1- Lista de reagentes utilizados.

Reagente	Fabricante
DMSO	Sigma-Aldrich
TrypLE™ Express Enzyme	Invitrogen
Azul de Trypan	Invitrogen
DTT (C ₄ H ₁₀ O ₂ S ₂)	Promega
DMEM	Invitrogen
EDTA (Ácido etileno di-Amino tetra-acético)	Sigma-Aldrich
Trisure	Bioline
Agarose	Sigma-Aldrich
NZY M-MuLV First-Strand cDNA Synthesis Kit	Nzytech
NZY qPCR Green Master Mix (2x)	Nzytech
PEG (Polietilenoglicol)	Sigma-Aldrich
SDS (Dodecilsulfato de sódio)	Sigma-Aldrich
Ácido clorídrico (HCl)	Sigma-Aldrich
Ácido nítrico (HNO ₃)	Sigma-Aldrich
Ácido cloroáurico tri-hidratado (HAuCl ₄ .3H ₂ O)	Sigma-Aldrich
Citrato de sódio tri-hidratado (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ .2H ₂ O)	Sigma-Aldrich
Hidróxido de sódio (NaOH)	Sigma-Aldrich
Acetato de Etilo	Sigma-Aldrich
Hidrogenofosfato de sódio (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich
Di-Hidrogenofosfato de sódio (NaH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich
Cloreto de sódio (NaCl)	Sigma-Aldrich
Etanol absoluto	Panreac
Fenol	Sigma-Aldrich
Clorofórmio	Sigma-Aldrich
Kit CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega

3.1.2. Soluções

. Tampão Fosfato 100 mM, pH8 (500 mL): 3,40 mL NaH₂PO₄ 1 M, 46,60 mL Na₂HPO₄ 1 M, 450 mL água Milli-Q filtrada.

. Solução AGE I: 2% (p/v) SDS, 10 mM Tampão Fosfato (pH8).

. Solução AGE II: 1,5 M NaCl, 0,01% (p/v) SDS, 10 mM Tampão Fosfato (pH 8).

3.1.3. Lista de *primers*

Tabela 3.2- Lista de *primers* utilizados.

<i>Primers</i>	Sequência 5'-3'	Tamanho (bp)	GC (%)	T _m (°C)
(F1) KRAS_e2 Fw	GGT GGA GTA TTT GAT AGT GTA	21	38,1	54
(R1) KRAS_e2 Rv	TGG ACC CTG ACA TAC TCC CAA G	22	54,5	55
(FA) KRAS FwA	GAG AGG CCT GCT GAA AAT GA	20	50	55,1
(FB) KRAS FwB	ATT TCG GAC TGG GAG CGA	18	55,6	56,3
(FV) KRAS FwV	TTG TGG ACG AAT ATG ATC CAA	21	38,1	51,6
(RV) KRAS RvV	TGA CCT GCT GTG TCG AGA AT	20	50	56,1
(F18s) 18S Fw	GTA ACC CGT TGA ACC CCA TT	20	50	55,3
(R18s) 18S Rv	CCA TCC AAT CGG TAG TAG CG	20	55	55,1

3.1.4. Lista de oligonucleotídeos silenciadores

Tabela 3.3- Lista de oligonucleotídeos silenciadores utilizados.

Oligonucleotídeo	Sequência 5'-3'	bases	Purificação	Modificações
SHantikrasWT	CTGGTGCAAGGCACTC TTGCCTACGCCACCAG	32	HPLC	5'-tiol C6 terminal
SHantikrasG13D	CTGGTGCAAGGCACTC TTGCCTACGTCACCAG	32	HPLC	5'-tiol C6 terminal

3.1.5. Lista de equipamento

Tabela 3.4- Lista de equipamento utilizado.

Modelo	Fabricante
SANYO CO2 Incubator	Electric Biomedical Co., Japão
Microscópio ótico invertido	Nikon Instruments, Japão
UVmini 1240 spectrophetometer	Shimadzu, Japão
Nanoparticle Analyzer, SZ-100	Horiba Scientific, Japão
Sigma 3-16K Centrifuge	Sigma-Aldrich, EUA
Sigma 1-14 Mini-Centrifuge	Sigma-Aldrich, EUA
Ultrasonic bath S10H	Elmasonic, Alemanha
Shaker GLF 3016	Butch & Holm, Dinamarca
Gel Doc imager	Bio-Rad, EUA
NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer	ThermoScientific, EUA
DNA Engine PTC-200 Peltier Thermal cycler Dual Block	Bio-Rad, EUA
MyCycler Thermocycler	Bio-Rad, EUA
Corbett Rotor-Gene 6000 thermal cycler	Qiagen, Alemanha
Leitor de Microplacas Infinite® M200	Tecan, Suíça

3.1.6. Lista de materiais

Tabela 3.5- Lista de materiais utilizados.

Modelo	Fabricante
Frascos de cultura T25	SPL Life Sciences, Coreia do Sul
Placas de 24 poços	SPL Life Sciences, Coreia do Sul
Placas de 96 poços	SPL Life Sciences, Coreia do Sul
Hemocitómetro	Hirschmann, Alemanha
Illustra™ NAP™ Columns, NAP-5	GE Healthcare, EUA

3.2. Métodos

3.2.1. Linhas celulares humanas

3.2.1.1. Características

No presente trabalho foram utilizadas duas linhagens de células tumorais humanas: HCT116 e HT29. Foi, adicionalmente às linhagens anteriores, também utilizado o cDNA das linhagens de células tumorais humanas A549 e A2780 [Tópico 3.2.4.4. Teste de *primers* para RT-qPCR] de forma a comprovar que o gene amplificado era o gene-alvo: *KRAS*. As linhagens

celulares provêm da American Type Culture Collection (ATCC®) e as suas características encontram-se na tabela 3.6.

Tabela 3.6- Características das linhagens celulares tumorais estudadas (origem, morfologia e propriedades).

Linhagem Celular	Organismo	Tecido	Doença	Morfologia	Propriedades
HCT116	<i>Homo sapiens</i> , humano	Colon	Carcinoma colorretal	Epitelial	Aderente
HT29	<i>Homo sapiens</i> , humano	Colon	Adenocarcinoma colorretal	Epitelial	Aderente
A549	<i>Homo sapiens</i> , humano	Pulmão	Carcinoma pulmonar	Epitelial	Aderente
A2780	<i>Homo sapiens</i> , humano	Ovário	Carcinoma do ovário	Epitelial	Aderente

3.2.1.2. Manutenção das culturas celulares

As células HCT116 e HT29 foram semeadas e mantidas em frascos T25 (SPL Life Sciences, Coreia do Sul) (densidade de 5×10^4 células) contendo meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) (suplementado com vermelho de fenol) numa estufa (SANYO CO₂ Incubator Electric Biomedical Co., Osaka, Japão) a 37°C, 5% (v/v) CO₂ e 99% (v/v) de humidade relativa.

Sempre que as culturas atingiam os 80% de confluência, foram realizadas subculturas de forma a evitar stress celular por falta de nutrientes, prevenindo que as vias metabólicas promovam mutações indesejadas, e manter as culturas celulares na fase exponencial do seu crescimento. Para isso, o meio é retirado, sendo adicionados 2 mL de TrypLE™ Express (Gibco®, Nova Iorque, EUA), para destacar as células aderentes das paredes do frasco de cultura (tripsinização) durante 5 minutos. Posteriormente este efeito é anulado pela adição do mesmo volume de meio DMEM. A suspensão celular é então transferida para tubos Falcon de 15 mL (SPL Life Sciences, Coreia do Sul) e centrifugada durante 5 minutos a 300 x g e 15 °C (Sigma 3-16K 10280, Tuttlingen, Alemanha). O sobrenadante é descartado e o sedimento de células ressuspensionado em 1 mL de meio DMEM.

Para a contagem celular foi utilizado o método de exclusão com azul de Trypan (Sigma, St. Louis, EUA), o qual permite distinguir as células não viáveis (membrana plasmática comprometida) das células viáveis. A contagem foi efetuada num hemocítmetro (Hirschmann, Eberstadt, Alemanha) recorrendo a um microscópio ótico invertido.

3.2.2. Análise mutacional ao nível do DNA genómico (gDNA)

3.2.2.1. Extração do gDNA

A extração do gDNA foi baseada no método *Phenol-chloroform isoamyl alcohol* (PCI), tirando proveito da solubilidade para separar, em diferentes fases, os diversos componentes celulares.

A suspensão celular foi centrifugada durante 5 minutos a 500 x g e o meio de cultura descartado. Seguidamente foram adicionados 300 µL Tris-EDTA (10 mM tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7,5) (solução tampão TE), o qual atua como agente quelante, protegendo os ácidos nucleicos (DNA e RNA) da degradação por parte de DNases e RNases, inativando-as. O processo de lise celular é conseguido submetendo a solução ao vórtex. Na *hotte*, 300 µL fenol foram adicionados de forma a promover a desnaturação proteica, e a solução, vigorosamente agitada durante 20 segundos, foi centrifugada durante 5 minutos a 14.000 x g com o fim de se obter uma separação de fases (os ácidos nucleicos permanecem na fase aquosa enquanto que as proteínas desnaturadas migram para a fase orgânica). À fase aquosa foi adicionado igual volume de clorofórmio:álcool isoamílico (24:1, v/v), de forma a promover a extração de lípidos, proteínas e polissacarídeos, os quais são dissolvidos na fase orgânica (inferior), permanecendo o DNA na fase aquosa (superior) após nova centrifugação de 5 minutos a 14.000 x g. A utilização conjunta de clorofórmio e de álcool isoamílico (agente antiespuma) permitem a redução da interfase e a lavagem da fase aquosa de restos fenólicos que tenham ficado na solução, aumentando assim o rendimento da extração. Seguidamente adicionou-se à fase aquosa 2x o seu volume de etanol absoluto e a solução foi mantida *overnight* (o.n.) a -20 °C para permitir a precipitação do DNA. A solução foi então centrifugada durante 10 minutos a 10.000 x g e 4 °C, o sobrenadante evaporado numa placa térmica, e o sedimento ressuspensionado em 20 µL água Milli-Q.

A quantificação do DNA extraído, os seus correspondentes rácios de absorvância 260/280 e 260/230, e o grau de contaminação foram obtidos por espectroscopia UV-Vis, recorrendo ao NanoDrop, de acordo com as instruções do fabricante. Por fim, de forma a verificar a integridade do DNA, foi efetuada uma eletroforese em 0,8% (p/v) de gel de agarose, utilizando o marcador de peso molecular Lambda DNA/Hind III.

3.2.2.2. Amplificação do gDNA

A partir de 100 ng de gDNA amplificou-se por *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Bio-Rad Thermocycler) um fragmento de 403 pb do gene *KRAS*, utilizando os *primers* *KRAS-forward* e o *KRAS-reverse* (Tabela 3.2). A amplificação por PCR foi efetuada num volume final de 20 µL contendo 0,1 µM de *primers*, 1x Buffer, 2 mM MgCl₂, 3% DMSO, 0,8 mM dNTPs e 1U Taq DNA polimerase II nas seguintes condições: 2 minutos de desnaturação inicial a 95 °C, seguidas de 30 ciclos de amplificação de desnaturação a 95 °C durante 30 segundos, emparelhamento dos

primers a 55 °C durante 30 segundos, alongamento a 72 °C durante 1 minuto, e um alongamento final a 72 °C durante 10 minutos.

De forma a verificar a amplificação correta do fragmento esperado, efetuou-se uma eletroforese em 1,5% (p/v) de gel de agarose corada com 1x GelRed, utilizando o marcador de peso molecular GeneRuler Ladder mix. Após confirmação do tamanho esperado, os produtos de PCR foram enviados para sequenciação na STABVIDA (Caparica, Portugal).

3.2.3. Nanoconjugados de ouro (Au-nanoconjugados)

3.2.3.1. Síntese de nanopartículas de ouro

AuNPs de 14 nm foram sintetizadas seguindo o protocolo descrito em Conde *et al.* (2013)¹¹². Todo o material de vidro utilizado para a síntese foi previamente tratado em *aqua regia* (HCl:HNO₃, 3:1), o.n, e lavado com água Milli-Q filtrada (18,2 MΩ.cm⁻¹ a 25°C).

Adicionar 250 mL de uma solução de HAuCl₄ 1 mM a 50 mL de uma solução de citrato de sódio 38,8 mM. O sistema foi mantido em refluxo durante 30 minutos. Posteriormente deixou-se o sistema arrefecer até à temperatura ambiente, em repouso e protegido da luz. As AuNP@citrato sintetizadas foram então caracterizadas por espectrometria UV-Vis e DLS.

3.2.3.2. Funcionalização com polietilenoglicol (PEG)

As AuNPs foram funcionalizadas com PEG modificado com grupo terminal 5'-tiol (C₁₅H₃₂O₇S, 356,48 Da), de forma a obter-se 30% de saturação da superfície. Resumidamente, foram adicionados volumes de soluções *stock* de AuNP@citrato, 2% SDS e 1 mg/mL O-(2-Mercaptoetil-O'-metil-hexa(etilenoglicol) (PEG), de forma a obterem-se concentrações finais de 10 nM, 0,028% e 0,003 mg/mL, respetivamente. A solução ficou a incubar 16h sob agitação. No dia seguinte, centrifugou-se a solução durante 40 minutos a 14.000 x g, e o precipitado foi sujeito a 3 lavagens e ressuspensionado em água Milli-Q. As AuNP@PEG foram caracterizadas por espectrometria UV-Vis e DLS, e armazenadas a 4 °C no escuro.

3.2.3.3. Preparação dos oligonucleotídeos silenciadores

Os oligonucleotídeos tiolados (tiol-ssDNA) foram recebidos liofilizados, necessitando de tratamento prévio antes de poderem ser utilizados para a síntese dos Au-nanoconjugados. Começaram por ser ressuspensionados em 100 µL de DTT 1 M e incubados à temperatura ambiente por 2h. Foram-lhes então adicionados 900 µL de água Milli-Q filtrada, de forma a ser atingida uma concentração de DTT 0,1 M, tendo sido incubados nestas condições por mais 1h. Os oligonucleotídeos foram então misturados com acetado de etilo (1:2, v/v), e a fase orgânica foi descartada após centrifugação de 5 minutos a 21.460 x g. Este processo foi repetido mais 2 vezes

e de seguida procedeu-se à purificação da fase aquosa através de uma coluna NAP-5, seguindo as instruções do fabricante e utilizando tampão fosfato 10 mM (ph 8) como eluente.

Os oligonucleotídeos purificados foram seguidamente quantificados por espectroscopia UV-Vis, recorrendo a NanoDrop, utilizando o coeficiente de extinção a 260 nm fornecido pelo fabricante do oligonucleotídeo (STABVIDA, Portugal).

Para controlo, 50 µL dos oligonucleotídeos purificados foram guardados à parte, passando por todos os passos efetuados na síntese de Au-nanoconjugados exceto a mistura com as AuNP@PEG.

3.2.3.4. Sínteses dos Au-nanoconjugados

Para a síntese dos Au-nanoconjugados foi seguido o protocolo de Veigas *et al.* (2014)¹¹³, onde os oligonucleotídeos purificados foram misturados com uma solução de AuNP@PEG num rácio de 1:100 (AuNP:oligo). Foi adicionada uma solução de AGE I, de forma a obter-se uma concentração final de 10 mM tampão fosfato (pH 8) 0,01% (p/v) SDS, e a amostra foi seguidamente sonificada 10 segundos em ultrassons e incubada 20 minutos à temperatura ambiente. Foram então adicionadas soluções de AGE II, com o objetivo de aumentar a força iónica da amostra, com intervalos de 20 minutos seguidos de 10 segundos de ultrassons, de forma a obterem-se concentrações finais de 0,05, 0,1, 0,2 e 0,3 M NaCl. Após a última adição a amostra foi incubada o.n. à temperatura ambiente.

Os Au-nanoconjugados obtidos foram distribuídos em tubos eppendorf e centrifugados durante 40 minutos a 21.460 x g. De seguida foram feitas 3 lavagens, onde se recolheram os sobrenadantes da primeira lavagem e se descartaram os restantes. Os sedimentos foram ressuspendidos em água Milli-Q e as amostras centrifugadas durante 40 minutos a 21.460 x g. Os sedimentos foram então recolhidos para um mesmo tubo eppendorf e armazenados a 4 °C no escuro, até futura utilização.

O controlo e os sobrenadantes recolhidos foram quantificados por espectroscopia UV-Vis recorrendo a NanoDrop, e os Au-nanoconjugados foram caraterizados por espectrometria UV-Vis e DLS.

3.2.3.5. Caraterização

3.2.3.5.1. Espectroscopia UV-Visível (UV-Vis)

Realizaram-se diversos espectros de absorvância utilizando o espectrofotómetro UV-Vis, de forma a podermos caraterizar as nanopartículas.

A concentração das AuNP@citrato, AuNP@PEG e AuNP@PEG@oligo foi determinada através da lei de *Lambert-Beer* (Equação 3.1). As nanopartículas devem apresentar um pico típico

de ressonância plasmática de superfície em torno de 520 nm com um coeficiente de extinção correspondente de $\sim 2,33 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

$$C = \frac{Abs_{520}}{\epsilon \cdot l} * \text{fator diluição} \quad \text{Equação 3.1}$$

Utilizando o método desenvolvido por Haiss *et al.* (2007)¹¹⁴ foi possível calcular o diâmetro aproximado das AuNP@citrato. A partir dos valores tabelados no material suplementar do mesmo, é possível traçar a reta de calibração do diâmetro (nm) das AuNP@citrato em função do rácio Abs_{SPR}/Abs_{450} ($= Abs_{520}/Abs_{450}$).

$$d = 0,112 * e^{2,9986 * (Abs_{520}/Abs_{450})} \quad \text{Equação 3.2}$$

3.2.3.5.2. *Dynamic Light Scattering (DLS)*

O diâmetro hidrodinâmico e o índice de polidispersão das AuNPs, AuNP@PEG e Au-nanoconjugados foi determinado por DLS. A análise foi realizada a 25 °C, com ângulo de dispersão de 90°, e diluindo a amostra em água Milli-Q filtrada, de forma a obter uma concentração final de 1 nM. A análise DLS foi realizada no Departamento de Química (FCT-UNL).

3.2.3.6. Teste de estabilidade

Os Au-nanoconjugados foram caracterizados por espectroscopia UV-Vis em soluções de tampão fosfato de sódio que variaram de pH 5 a pH 8, de forma a perceber se os mesmos seriam ou não estáveis na mesma gama de pH que encontrariam dentro do corpo humano (existência ou não de agregação). As soluções de pH foram preparadas de acordo com Sambrook *et al.* (2001)¹¹⁵. e os espectros de absorvância de AuNP@PEG, e de ambas as sondas AuNP@PEG@WT e AuNP@PEG@G13D, em conjunto e individualmente, foram recolhidos e os seus picos analisados. As concentrações das AuNPs foram as mesmas às utilizadas em 3.2.4.1. Ensaaios Celulares.

3.2.4. Expressão genética

3.2.4.1. Ensaios celulares

Para estes ensaios *in vitro*, as células foram semeadas em placas de 24 poços de forma a termos 1×10^5 células por poço. No dia seguinte as células foram expostas a diferentes condições AuNP@PEG e/ou Au-nanoconjugados. As células foram incubadas com: 1) simultaneamente com 0,38 nM da sondaWT e 0,43 nM da sondaG13D, correspondendo, individualmente, a 20 nM

de oligonucleotídeo (total: 0,81 nM; rácios Au:oligo = 1:52 e 1:46, respetivamente); e 2) cada uma das sondas nas mesmas concentrações em separado (perfazendo a concentração que seria ocupada pela outra sonda com AuNP@PEG). Para controlo, as células foram desafiadas com 0,81 nM de AuNP@PEG.

3.2.4.2. Extração do RNA total

As células expostas às diferentes condições anteriormente referidas, foram incubadas numa estufa a 37 °C, 5% (v/v) CO₂ e 99% (v/v) de humidade relativa durante 6h a 18h, e recolhidas por centrifugação findo o período de incubação. O RNA Total foi extraído utilizando o método TRIsure (Bioline, Taunton, MA, USA). Resumidamente, a amostra biológica foi homogeneizada em 300 µL de TRIsure de forma a obter-se lise celular, e a solução foi transferida para tubos eppendorf, ficando a incubar 5 minutos à temperatura ambiente. Foram adicionados 150 µL de clorofórmio à solução, a qual foi agitada durante 15 segundos de forma a misturar-se o seu conteúdo, e ficou 3 minutos a incubar à temperatura ambiente. De seguida, os tubos eppendorf foram centrifugados durante 15 minutos a 12.000 x g, obtendo-se uma separação de fases em fase aquosa e fase orgânica. A fase aquosa (sem cor), onde se encontra o RNA, foi transferida para novos tubos eppendorf, aos quais foram adicionados 300 µL de isopropanol (-20 °C). As soluções incubaram o.n. a uma temperatura de -20 °C de forma a aumentar o rendimento de precipitação do RNA. No dia seguinte a solução começou por ficar a incubar 10 minutos à temperatura ambiente e foi centrifugada durante 10 minutos a 12.000 x g e 4 °C, descartando de seguida o sobrenadante. As lavagens foram efetuadas adicionando às amostras 500 µL de etanol 75% e centrifugando a solução durante 5 minutos, a 7.500 x g e 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o RNA foi ressuspendido em 15 µL de água DEPC a 60 °C, o qual ficou a incubar durante 10 minutos. As amostras foram colocadas em gelo (4 °C) e quantificadas no NanoDrop por espectroscopia UV-Vis. O armazenamento do RNA Total extraído deverá ser feito a temperaturas de -80°C.

3.2.4.3. Síntese de cDNA

O RNA Total (100 ng) extraído foi reversamente transcrito utilizando o kit NZY M-MuLV First-Strand cDNA Synthesis (NZYTech, Lisboa, Portugal), de acordo com as instruções do fabricante, para um volume final de 10 µL. Uma vez que temos diversas amostras de RNA, correspondentes às diferentes condições tidas em 3.2.4.1 Ensaios Celulares foi preparada, em gelo, uma mistura (*master mix*) sem RNA, com os componentes da mistura de reação que integram a tabela 3.7. A *master mix* foi distribuída pelos vários tubos de microcentrifugação, onde foi adicionado o RNA previamente preparado*. No tubo correspondente ao controlo, em vez de RNA, foi adicionado o mesmo volume em água DEPC.

Tabela 3.7- Componentes da Mistura de Reação e respetivos volumes utilizados. Volume final de 10 µL.

Reagentes	Vol.
NZYRT 2× Master Mix	5 µL
NZYM-MuLV RT Enzyme Mix	1 µL
RNA (100 ng)	2 µL*
DEPC-treated H ₂ O	2 µL

*Foram previamente preparadas alíquotas do RNA Total extraído, de forma aos volumes adicionados em cada tubo de microcentrifugação serem uniformes.

As amostras foram misturadas gentilmente e colocadas no Bio-Rad a incubar: 1 ciclo a 25 °C durante 10 minutos, seguido de 1 ciclo a 37 °C durante 50 minutos, finalizando com 1 ciclo a 85 °C durante 5 minutos para inativar a reação. De seguida foram adicionados, em cada tubo de microcentrifugação, 0,5 µL de NZY RNase H de forma a remover a ligação do RNA ao cDNA recém sintetizado. As amostras foram agitadas no vórtex, para homogeneizar, e colocadas a incubar a 37 °C durante 20 minutos na placa térmica. O cDNA sintetizado foi armazenado a -20 °C até futura utilização.

3.2.4.4. Teste de *primers* para RT-qPCR

De forma a comprovar a especificidade dos 3 conjuntos de *primers* desenhados (KRAS FA, KRAS FB, KRAS FV e KRAS RV) e de forma a selecionar o mais indicado para futuras experiências RT-qPCR, cDNA sintetizado a partir de 3 linhas celulares distintas (HCT116, A549 e A2780) foi amplificado por PCR, utilizando 3 conjuntos de *primers* diferentes: KRAS FA (5'-GAGAGGCCTGCTGAAAATGA-3'), KRAS FB (5'-ATTTCGGACTGGGAGCGA-3'), KRAS FV (5'-TTGTGGACGAATATGATCCAA-3'), com o KRAS RV (5'-TGACCTGCTGTGTGCGAGAAT-3'). A amplificação por PCR de 100 ng de cDNA foi efetuada num Bio-Rad Thermocycler para um volume final de 20 µL utilizando 0,1 µM dos *primers* específicos, 1x Buffer, 2 mM MgCl₂, 3% DMSO, 0,8 mM dNTPs e 1U Taq DNA polimerase II nas seguintes condições: 2 minutos de desnaturação inicial a 95 °C, seguidas de 30 ciclos de amplificação de desnaturação a 95 °C durante 30 segundos, emparelhamento dos *primers* a 55 °C durante 30 segundos, alongamento a 72 °C durante 1 minuto, e um alongamento final a 72 °C durante 10 minutos.

De forma a verificar a amplificação realizada, efetuou-se uma eletroforese em 2% de gel de agarose corada com 1x GelRed, utilizando o marcador de peso molecular GeneRuler Ladder mix. O produto de PCR, correspondente à amplificação de HCT116 com o conjunto de *primers* FAXRV, foi remetido para sequenciação na STABVIDA (Caparica, Portugal).

3.2.4.5. Real-Time quantitative PCR (RT-qPCR)

A expressão genética de *KRAS* em células HCT116 foi avaliada através de qPCR. A amplificação do cDNA por qPCR foi realizada num termociclador Corbett Rotor-Gene 6000 (Qiagen, Hilden, Alemanha) utilizando a NZY qPCR Green Master Mix (2x) (NZYTech, Lisboa, Portugal), de acordo com as instruções do fabricante. A mistura de reação foi preparada para um volume final de 20 µL com 1 µL de cDNA e os seguintes *primers*, a uma concentração de 400 nM cada: *KRAS forward* (5'-GAGAGGCCTGCTGAAAATGA-3') e *KRAS reverse* (5'-TGACCTGCTGTGTCGAGAAT-3'); *18S forward* (5'-GTAACCCGTTGAACCCCAT-3') e *18S reverse* (5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'). As condições do qPCR incluíram uma desnaturação inicial de 5 minutos a 95 °C, seguida de 30 ciclos de desnaturação a 95 °C durante 30 segundos, emparelhamento dos *primers* a 55 °C durante 30 segundos e alongamento a 72 °C durante 30 segundos. Os resultados de RT-qPCR foram analisados pelo método Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$), onde a expressão genética relativa é dada pela quantificação do Gene de Interesse (*KRAS*) relativamente a um Gene de Controlo Interno (*18S*), e normalizado à Condição Controlo. Os valores de ΔCt e $\Delta\Delta Ct$ foram assim calculados de acordo com as seguintes equações:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Gene de Interesse}} - Ct_{\text{Gene de Controlo Interno}} \quad \text{Equação 3.3}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Condição em Estudo}} - \Delta Ct_{\text{Condição Controlo}} \quad \text{Equação 3.4}$$

$$\text{Expressão Genética Relativa} = 2^{-\Delta\Delta Ct} \quad \text{Equação 3.5}$$

De forma a verificar a amplificação realizada, efetuou-se uma eletroforese em 2% de gel de agarose, utilizando o marcador de peso molecular GeneRuler Ladder mix.

3.2.5. Viabilidade celular

3.2.5.1. MTS

As células HCT116 foram semeadas numa placa de 96 poços (SPL Life Sciences) (densidade celular de $0,75 \times 10^4$ células) contendo meio DMEM numa estufa (SANYO CO₂ Incubator Electric Biomedical Co., Osaka, Japão) a 37 °C, 5% (v/v) CO₂ e 99% (v/v) de humidade relativa, onde permaneceram a incubar durante 24h para aderirem ao fundo dos poços. No dia seguinte, o meio DMEM foi substituído e as células foram expostas a diferentes condições AuNP@PEG e/ou Au-nanoconjugados. As células foram incubadas: 1) simultaneamente com 0,38 nM da sondaWT e 0,43 nM da sondaG13D, correspondendo, individualmente, a 20 nM de oligonucleotídeo (total: 0,81 nM; rácios Au:oligo = 1:52 e 1:46, respetivamente); e 2) cada uma das sondas nas mesmas concentrações em separado (perfazendo a concentração que seria ocupada pela outra sonda com AuNP@PEG). Para controlo, as células foram desafiadas com 0,81 nM de AuNP@PEG. A placa foi então colocada na estufa, onde as células permaneceram em incubação

durante os tempos estudados para os ensaios de expressão genética (6h e 18h). Após incubação, descartar o meio DMEM de cada poço e substituir por 100 µL de uma alíquota previamente preparada de meio DMEM misturado com reagente MTS (meio DMEM: reagente MTS, 80 µL:20 µL). Foi também realizado um ensaio nas mesmas condições anteriormente referidas, mas na ausência de células, de forma a confirmar que os construtos não interagem com a solução de MTS. A placa foi colocada na estufa, onde ficou a incubar por 45 minutos. De seguida, a absorvância de cada poço foi medida a 490 nm num leitor de microplacas (Infinite® M200, Tecan, Suíça) e a viabilidade celular foi calculada de acordo com a fórmula abaixo:

$$Viabilidade\ Celular\ (\%) = \frac{(m\u00e9dia\ Abs\ do\ grupo\ de\ Tratamento)}{(m\u00e9dia\ da\ Abs\ do\ grupo\ Controlo)} \times 100 \quad \text{Equa\u00e7\u00e3o 6}$$

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização da linhagem celular tumoral

De forma a ser possível, numa última fase, realizar experiências de silenciamento genético, primeiramente é necessário analisar as linhas celulares a utilizar. De entre todas as possibilidades, as HCT116 têm sido frequentemente utilizadas em estudos realizados no laboratório e, portanto, têm sido exaustivamente classificadas, analisadas e caracterizadas; sabendo-se à priori que internalizam as AuNPs a utilizar. De acordo com ATCC® *CELL LINES BY GENE MUTATION*, esta linha celular é heterozigótica para a mutação p.G13D, representando assim interesse no que diz respeito a terapias personalizadas. Para além de HCT116, foi também utilizada nesta tese uma outra linha celular: HT29, a qual é homozigótica para a sequência WT. Tendo em conta que as experiências a realizar dependem de material vivo (células), começou por ser feito um estudo tendo como objetivo determinar a velocidade de crescimento das mesmas. Desta forma, realizou-se uma análise ao microscópio para contabilizar a confluência celular ao longo de vários dias e uma curva de crescimento foi construída (Figura 4.1). Apenas fui responsável pelo controlo das passagens semanais para a linhagem celular tumoral HT29, tendo recebido alíquotas de trabalho de células HCT116 quando necessárias. No entanto, os valores verificados para o seu crescimento não divergem em muito das de HT29, tal como pode ser verificado em *Thawing, Propagation, and Cryopreserving Protocol* (ATCC®CCL-247™).

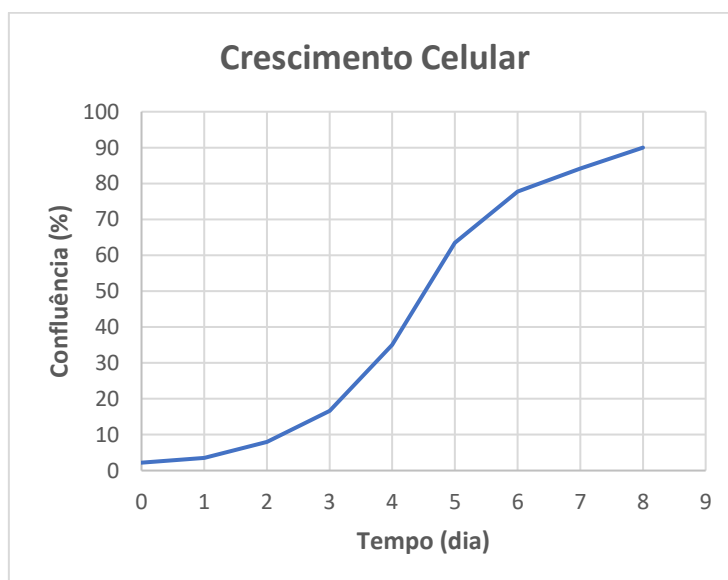


Figura 4.1- Curva de crescimento da linha celular em estudo (HT29).

As linhas celulares em estudo são categorizadas como sendo células aderentes, crescendo coladas às paredes dos frascos. Para as passagens é utilizado Gibco Tryple™ Express Enzyme (TE), onde as células são descoladas do frasco num processo chamado de tripsinização. Esta é a principal razão de praticamente não se verificar crescimento celular nas primeiras 24h, pois as

células precisam de primeiramente aderir às paredes do novo frasco e a adaptarem-se ao novo microambiente. Iniciando numa concentração reduzida, num meio rico em nutrientes e a condições de temperatura e humidade propensas ao seu crescimento, as células rapidamente entram na fase exponencial do seu crescimento. No entanto, à medida que a confluência aumenta, os nutrientes começam a esgotar-se no meio de cultura e as células entram numa fase estacionária. Uma confluência demasiado elevada (+90%) poderá influenciar as vias metabólicas e promover a ocorrência de determinadas mutações, o que não é aconselhável para trabalhos cujo objetivo passa por analisar diferenças na expressão genética, trabalhando com sequências genéticas específicas. Na maioria dos casos, culturas com densidades celulares elevadas esgotam o meio mais rapidamente do que culturas com baixa densidade celular, notando-se uma mudança evidente no pH do meio de cultura. Uma queda no pH é geralmente acompanhada por um aumento na densidade celular, indicando que se deverá proceder a uma subcultura. As células poderão parar de crescer quando o pH se encontrar entre pH 7 e pH 6, sendo a viabilidade celular perdida entre pH 6,5 e pH 6 (ATCC®CCL-247™).

4.2. Análise do perfil de KRAS

Com vista à sequenciação das linhas celulares HCT116 e HT29, uma extração de DNA genómico foi realizada. Após a extração, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria UV-Vis, estando os seus valores descritos na tabela 4.1.

Tabela 4.1- Valores experimentais fornecidos pelo NanoDrop, a partir de amostras de DNA genómico extraído de linhas celulares HCT116 e HT29.

Amostra	Abs ₂₆₀ /Abs ₂₈₀	Abs ₂₆₀ /Abs ₂₃₀	ng/μL
HCT116	2,04	1,80	829,0
HT29	2,01	1,67	1470,9

De forma a avaliar a qualidade das amostras, são geralmente analisados os rácios 260/280 e 260/230, assim como a qualidade dos espectros obtidos. Segundo a bibliografia, para soluções puras de ácidos nucleicos, geralmente obtêm-se nos rácios 260/280 valores de ~1,8 para DNA e de ~2,0 para RNA, e nos rácios 260/230 valores na faixa dos 1,8-2,2 para DNA puro. Estes valores, no entanto, irão variar dependendo de diversos fatores: pH, força iónica do tampão utilizado, ou até mesmo por contaminação proteica ou de compostos utilizados na extração como por exemplo compostos fenólicos (ThermoFisher, TN52646_E 02/15M). Os valores do rácio 260/280 para ambas as linhas celulares remetem para a existência de RNA puro nas amostras, no entanto, os valores dos seus rácios 260/230 são indicativos do contrário. O valor deste último rácio para HCT116 enquadra-se nos valores descritos na bibliografia para DNA puro, criando assim a dúvida em relação ao seu grau de pureza; já para HT29, o valor é mais reduzido do que o

esperado, sendo consistente com o que se verifica aquando da contaminação por compostos fenólicos. De forma a verificar a integridade do DNA extraído, fez-se uma eletroforese em gel de agarose (Figura 4.2).

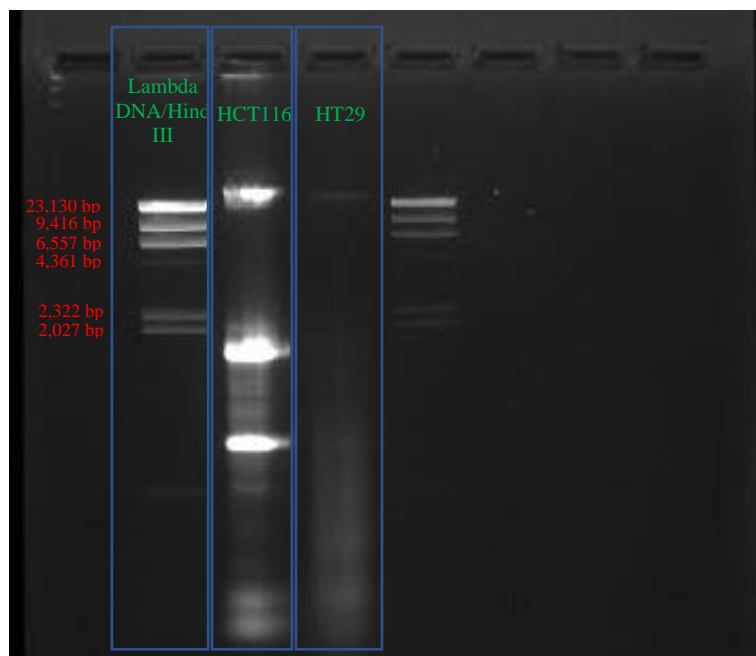


Figura 4.2- Eletroforese em 0,8% de gel de agarose (70 V, 1h) referente à integridade dos ácidos nucleicos extraídos das linhagens tumorais humanas HCT116 e HT29 (GelDoc). Nos poços temos: o marcador molecular Lambda DNA/Hind III, e os ácidos nucleicos previamente extraídos, correspondentes a: HCT116 e HT29. O corante utilizado no gel foi o GelRed.

Na figura 4.2 conseguimos visualizar diferentes bandas, correspondentes a: DNA genómico, RNA, DNA ribossomal e mRNA, respetivamente. Esta informação corrobora com a análise anterior referente à pureza das amostras, evidenciando a existência de pelo menos 4 estruturas distintas de ácidos nucleicos na amostra.

Seguidamente à extração de DNA genómico realizada, é agora necessário amplificar a zona de interesse. Uma vez que a zona de interesse se situa muito perto do codão de iniciação no exão 2 do gene *KRAS*, os *primers* utilizados foram desenhados de forma à sequência-alvo se encontrar fora do mesmo, para flanquear todo o exão. A sequência do gene *KRAS* foi retirada do NCBI (*Reference Sequence: NC_000012.12*), a qual pode ser consultada em 7.2. Sequência *KRAS* (NCBI).

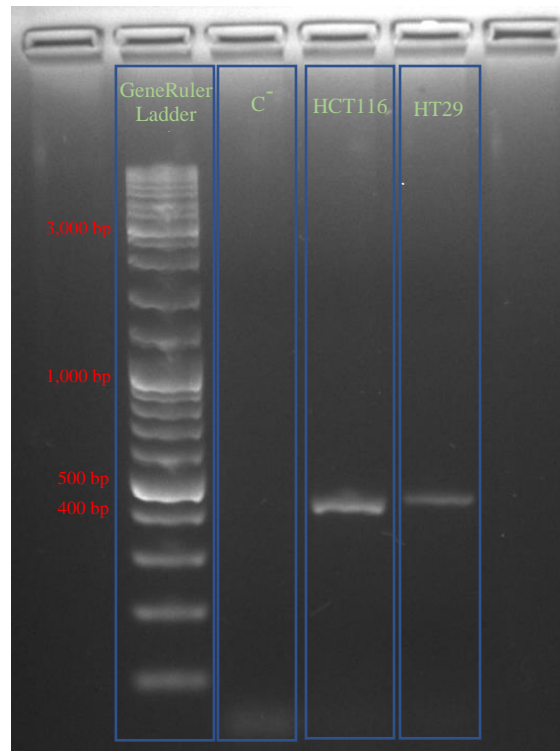


Figura 4.3- Eletroforese em 1,5% de gel de agarose (80 V, 1h10) para verificação dos tamanhos (pb) de sequência amplificados por PCR, após extração a partir das linhagens tumorais humanas HCT116 e HT29 (GelDoc). Nos poços temos: GeneRuler Ladder mix, Controlo negativo, gDNA HCT116 e gDNA HT29, respetivamente.

Assim, de forma a verificar se a amplificação fora bem-sucedida, correu-se uma eletroforese em 1,5% de gel de agarose, como demonstrado na figura 4.3. É possível verificar que a sequência flanqueada pelos *primers forward* e *reverse*, que segundo a bibliografia totaliza em 403 bp, vai de encontro ao resultado obtido no gel após amplificação por PCR. No poço correspondente ao controlo negativo, este não possuindo DNA (nem estando contaminado), encontramos uma banda no final do gel que corresponde aos *primers* utilizados. Nos poços seguintes podemos observar a amplificação da zona-alvo do gDNA das linhas celulares de HCT116 e HT29, respetivamente, não sendo observável a banda correspondente aos *primers*, significando que os mesmos foram utilizados na reação durante a experiência realizada. Podemos assim também retirar como elação que as condições utilizadas são propensas a uma amplificação bem-sucedida, não existindo desperdício do conjunto de *primers* utilizados na amplificação.

A amplificação por PCR resultou em bandas intensas que vão de encontro ao tamanho da sequência flanqueada pelos *primers*. Os produtos de PCR foram sequenciados pela STABVIDA (Caparica, Portugal) e analisados para identificação de mutações no codão 13 (ver também 7.4. Sequenciação Sanger).

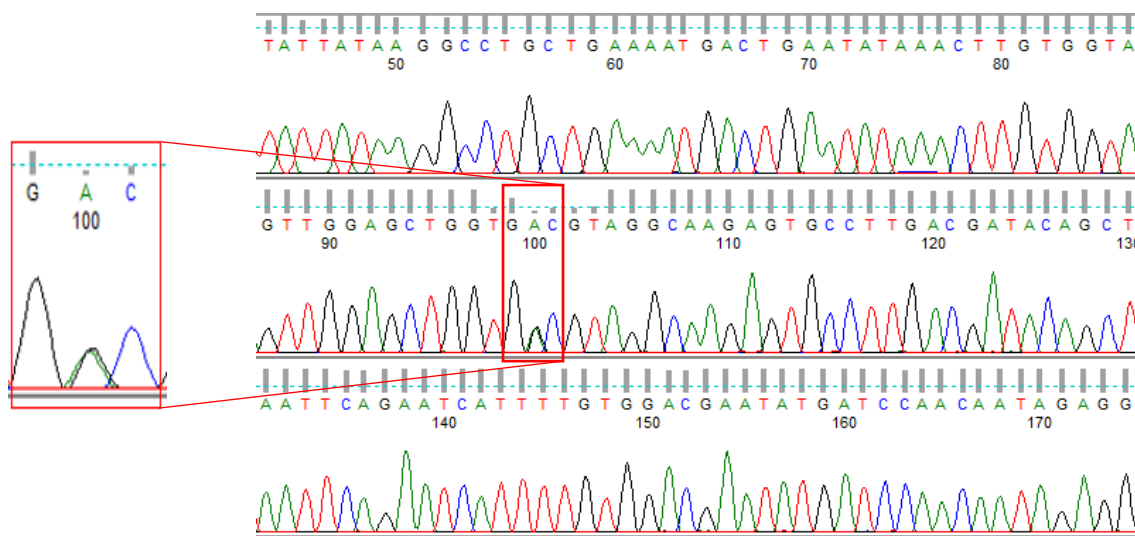


Figura 4.4- Sequenciação Sanger realizada pela STABVIDA (Caparica, Portugal) das amostras de gDNA extraídas da linhagem celular tumoral HCT116, previamente amplificadas por PCR.

De acordo com o cromatograma (Figura 4.4), a linhagem HCT116 é heterozigótica para o *locus* em estudo, uma vez que foi detetada tanto uma “A” quanto uma “G” para o codão 13 de *KRAS*. Esta linha celular possui assim um alelo WT e um alelo com a mutação G13D. Estes resultados corroboram a caracterização remetida pela ATCC®. Todavia, e como o projeto se baseia na capacidade de discriminação diferencial dos alvos moleculares a silenciar, a caracterização molecular aqui demonstrada é da maior relevância pois é sabido que a manutenção de linhagens celulares em cultura pode levar ao aparecimento e manutenção de alterações genómicas indesejáveis.

Foi realizado um BLASTn contra o genoma humano (Figuras 7.2 e 7.4), podendo ser confirmado que apenas este nucleótido apresenta o *mismatch*. Na figura 7.4 são observáveis dois nucleotídeos que não foram identificados na sequenciação realizada pela STABVIDA para o *primer reverse*, no entanto, os mesmos foram identificados na sequenciação com o *primer forward* e vão de encontro ao que observamos na sequência retirada do NCBI.

Seguindo a mesma abordagem, permite corroborar que a linhagem celular HT29 é homozigótica WT (Figura 4.5), apresentando apenas uma “G” na posição de interesse. Foi realizado um BLASTn contra o genoma humano (Figuras 7.6 e 7.8) e podemos observar que o nucleótido não apresenta o *mismatch* na posição de interesse.

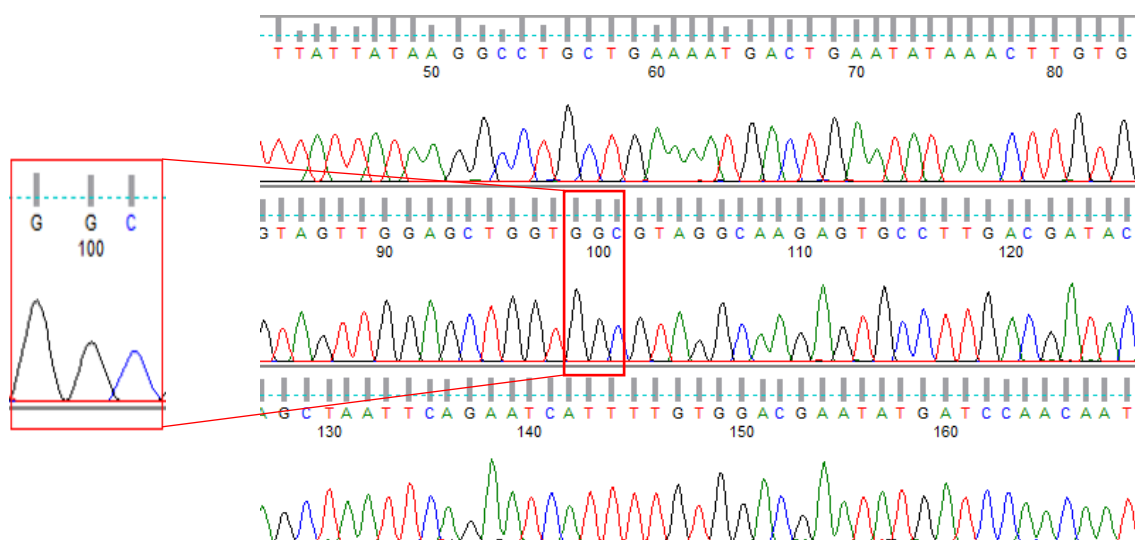


Figura 4.5 - Sequenciação Sanger realizada pela STABVIDA (Caparica, Portugal) das amostras de gDNA extraídas da linhagem celular tumoral HT29, previamente amplificadas por PCR .

4.3. Au-nanoconjugados

Após uma primeira fase onde a sequência do gene-alvo foi determinada, entramos agora na segunda fase, na qual serão construídos os Au-nanoconjugados que a irão alvejar.

Os mecanismos dos oligonucleotídeos ssDNA silenciadores constituem uma das estratégias mais estudadas nas últimas décadas para a inibição da expressão genética. O silenciamento funciona tendo por base a utilização de moléculas *antisense* específicas que hibridam com o mRNA alvo e interrompem a produção proteica, ativando a RNase H a qual seguidamente cliva os híbridos de DNA/RNA; via bloqueio estérico da tradução; ou modulando *splicing* alternativos¹¹⁶⁻¹¹⁸.

4.3.1. Síntese

A síntese das AuNPs é comumente conseguida reduzindo quimicamente a valência dos átomos de um composto precursor de ouro, de Au^{3+} para Au^0 , na presença de um agente de revestimento. Este é capaz de se ligar à superfície das AuNPs, bloqueando o seu crescimento e estabilizando o coloide no solvente utilizado, permitindo assim um controlo sobre a forma e o tamanho das AuNPs sintetizadas, e evitando a sua agregação¹¹⁹.

No método de redução de citrato de Tukevich *et al.* (1951)¹²⁰, um dos mais utilizados para ensaios biológicos devido à sua simplicidade e ao seu alto rendimento, o citrato é utilizado como agente de revestimento¹²¹. A utilização do mesmo, permite não só o controlo anteriormente referido ao variar os rácios entre a sua concentração e a dos sais de ouro em solução^{122,123}, como ainda facilita o tratamento pós-síntese das AuNPs, sendo facilmente substituído por outros agentes de revestimento em funcionalizações subsequentes¹¹⁹. As soluções coloidais de AuNPs sintetizadas a partir deste método apresentam uma coloração avermelhada¹²⁴ e as partículas em si um diâmetro de 10-30 nm, estáveis e com carga negativa devido à adsorção eletrostática fraca do citrato à superfície das mesmas. Embora este método tenha tido limitações referentes à estabilidade e

dispersividade dos seus produtos, nos últimos anos diversos ajustes têm sido feitos de forma a obter-se uma maior monodispersividade e um melhor controle do tamanho das partículas produzidas¹²¹.

A adição de PEG às AuNPs tem sido vastamente estudada nos últimos anos, sendo comumente utilizado em abordagens para aumentar a eficiência da entrega de fármacos a células e tecidos. O revestimento de PEG protege a superfície das AuNPs da agregação, opsonização e fagocitose, prolongando o tempo de circulação sistêmica¹²⁵. A funcionalização das AuNPs com PEG foi realizada de forma a apenas obtermos uma percentagem de 30% à superfície das mesmas, pois como o objetivo do trabalho é estudar o silenciamento genético, parte da superfície das AuNPs precisará estar disponível para posterior funcionalização com ssDNA. O PEG utilizado possui uma terminação tiolada, a qual apresenta uma elevada afinidade com o ouro e consegue facilmente substituir o citrato anteriormente revestindo completamente as AuNPs. Ao envolver as AuNPs, este polímero diminui a atração entre elas devido tanto a um aumento da distância estérica entre as mesmas, como a um aumento hidrofílico através da formação de ligações de hidrogénio entre as repetições de éter com solvente, aumentando a sua estabilidade em solução¹²⁶.

4.3.2. Desenho dos oligonucleotídeos silenciadores (ASOs)

A abordagem *antisense* depende da eficiência da ligação dos ASOs às sequências alvo, dependendo assim do: comprimento e conteúdo do ASOs, existência de estruturas secundárias, propriedades termodinâmicas e a acessibilidade do alvo.

Para a realização do presente trabalho, os ASOs foram construídos de forma a alvejar o mRNA transcrito do gene *KRAS* (Figura 4.6). Como pudemos anteriormente verificar, embora a linhagem celular HT29 seja homozigótica e apenas transcreva uma sequência a partir do seu gDNA, a linhagem celular HCT116 é heterozigótica, transcrevendo o seu gDNA duas sequências de mRNA distintas (Figuras 4.4 e 4.5). De acordo com a literatura, a adição de 6 nucleotídeos à extremidade 5' do ssDNA complementares aos primeiros 6 da extremidade 3', induz a formação de uma estrutura em *loop* (*hairpin*) e, conseqüentemente, aumenta a seletividade do mesmo, garantindo que apenas se abrirá na presença de uma sequência que lhe seja totalmente complementar. O palíndroma não pode envolver muitos nucleotídeos pois se for demasiado estável os ssDNA não se abrirão ao encontrar a sua sequência mRNA complementar. Segundo a bibliografia, o *hairpin* formado deverá ser constituído por 20 nucleotídeos, de forma a aumentar o reconhecimento entre a sonda e o mRNA alvo. É também sabido que a primeira posição que se segue ao palíndroma está intimamente relacionada com a especificidade que a sonda terá com o a sequência alvo.

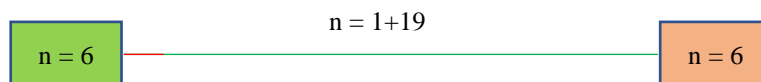


Figura 4.6 - Esquema base da construção dos oligonucleotídeos silenciadores anti-*KRAS*. Legenda: Caixa verde: 6 nucleotídeos imediatamente antes da localização da mutação-alvo; Reta vermelha: posição da mutação-alvo; Reta verde: 19 nucleotídeos seguintes à posição da mutação-alvo; Caixa Laranja: Sequência de 6 nucleotídeos adicionada à sequência de forma a obter-se um palíndromo com com os primeiros 6 nucleotídeos.

Tendo em conta os pormenores anteriormente discutidos, as sequências desenhadas (Tabela 3.3 e 4.2) foram analisadas pelo NUPACK, de forma a percebermos se e que estruturas secundárias se formariam, assim como as suas energias livres de Gibbs (ΔG).

Através do NUPACK, tal como se observa nas figuras 4.7 e 4.8, verificou-se que estes construtos apresentam estruturas secundárias, sendo as suas energias livres de Gibbs de -7,51 kcal/mol, a qual é considerada elevada. Existe apenas uma diferença na estrutura secundária de ambos os construtos, a qual se prende a uma ligação que o nucleótido de interesse faz em WT mas não quando se encontra mutado.

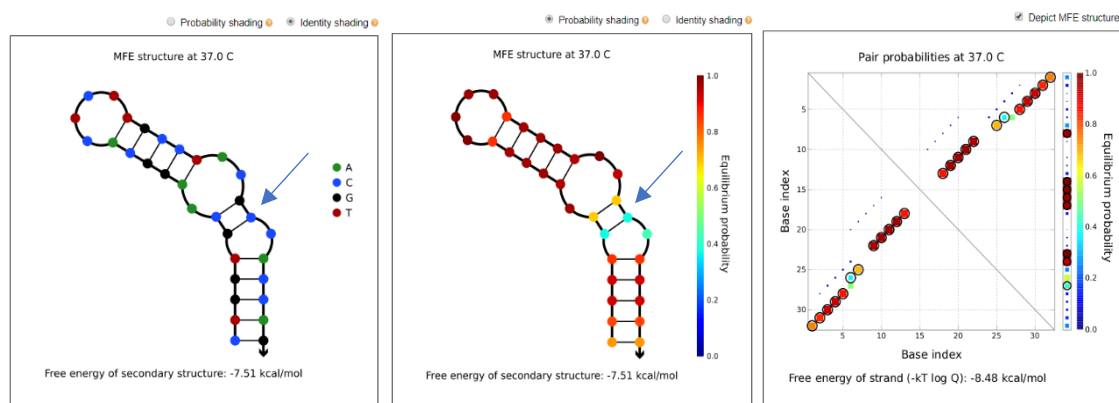


Figura 4.7- Estrutura do oligonucleotídeo silenciador anti-*KRAS* WT desenhado, obtida através do NUPACK.

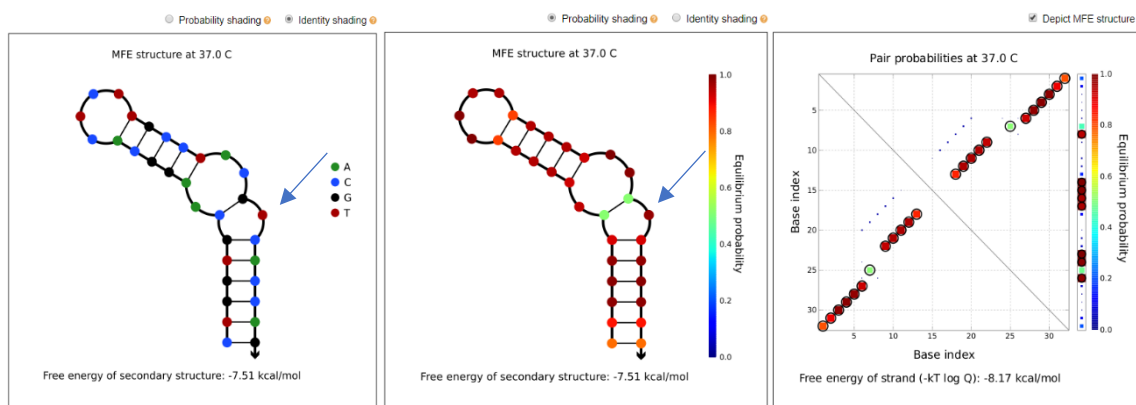


Figura 4.8 - Estrutura do oligonucleotídeo silenciador anti-*KRAS* G13D desenhado, obtida através do NUPACK.

Pelo idtdna, através da ferramenta “*hairpin*” foi possível perceber as estruturas secundárias formadas pelo oligonucleotídeo (Figura 4.9). Estas estruturas e os seus ΔG não diferem muito das fornecidas pelo NUPACK, para ambos os ssDNA WT e G13D.

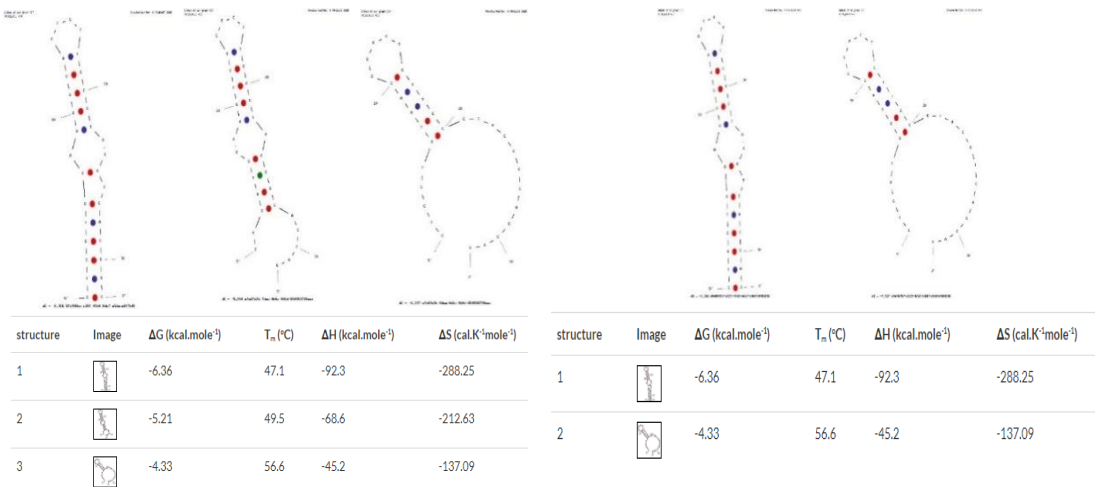


Figura 4.9- Estrutura dos oligonucleotídeos anti-KRAS WT e anti-KRAS G13D desenhados, obtida através da ferramenta “*hairpin*” do idtdna.

Através da ferramenta “*selfdimer*” do idtdna, foi também possível averiguar a afinidade do oligonucleotídeo com ele próprio, simulando de certa forma, o que poderá acontecer entre os oligonucleotídeos funcionalizados às AuNP@PEG, devido à proximidade entre os mesmos. No entanto os seus valores de ΔG não atingem os -10 kcal/mol (Figura 4.10).

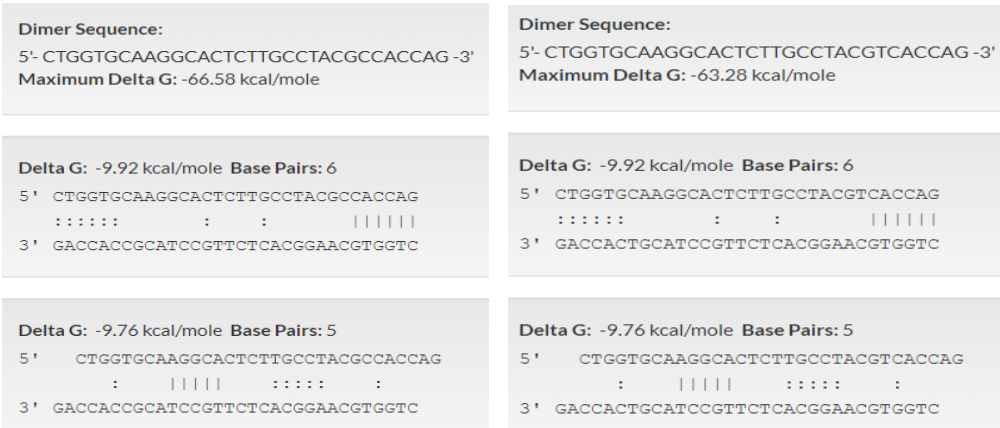


Figura 4.10- Emparelhamento das sequências de oligonucleotídeos anti-KRAS WT e anti-KRAS G13D desenhados, com eles próprios, e correspondentes ΔG 's, obtidos através da ferramenta “*selfdimer*” do idtdna.

A sequência de cDNA observada no ensembl corresponde à sequência “funcional”, correspondendo à sequência de mRNA alvo (com a devida substituição dos “U” por “T”). Assim sendo, a sequência do ssDNA desenhada terá de lhe ser a complementar invertida. Desta forma, através da ferramenta “*heterodimer*” do idtdna (Figura 4.11) verificou-se que a afinidade dos oligonucleotídeos desenhados para com a sequência de cDNA. Esta é superior (valor WT = -53,52 kcal/mole; valor G13D = -50,23 kcal/mole) tanto à dos “*selfdimer*” quanto dos “*hairpin*” formados pelos oligonucleotídeos. Assim, espera-se que a hibridação mRNA-oligonucleotídeo seja propensa a realizar-se, desenrolando assim o oligonucleotídeo aquando da aproximação com a sequência mRNA.

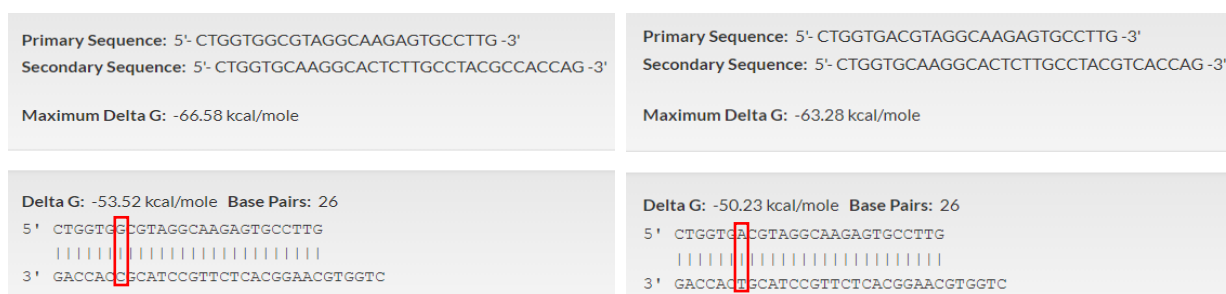


Figura 4.11- Emparelhamento das sequências de oligonucleotídeos anti-*KRAS* WT e anti-*KRAS* G13D desenhados, com os correspondentes cDNA-alvo, e correspondentes ΔG 's, obtidos através da ferramenta “*heterodimer*” do idtdna.

Tendo em mente a possibilidade de futuros estudos que tenham como objetivo uma otimização do desenho de sondas para silenciamento, foram analisadas todas as permutações teóricas possíveis para o codão alvo (codão 13, exão 2, do gene *KRAS*) (Figura 4.12). Esta análise foi realizada com a ajuda do Pós-Doc Bruno Veiga.

Estes estudos envolveriam não só a influência da estabilidade das conformações do *hairpin*, como também da influência da localização da mutação de interesse no próprio *hairpin*. Na figura 4.12 é possível verificar a mutação alvo localizada no início (A-D), meio (E-H, J-K) e fim (I, L) de um *hairpin* tanto numa conformação aberta (A-D, G, H, K, L) como fechada (E, F, I). Uma conformação aberta facilita o processo de hibridação ssDNA-mRNA devido a uma maior disponibilidade das sequências na zona do *hairpin*, no entanto mesmo em conformações com *hairpin* teoricamente fechado, no endossoma o pH e o ambiente redutor conduzem a uma desnaturação dos *hairpins*, resultando também na disponibilidade da sequência.

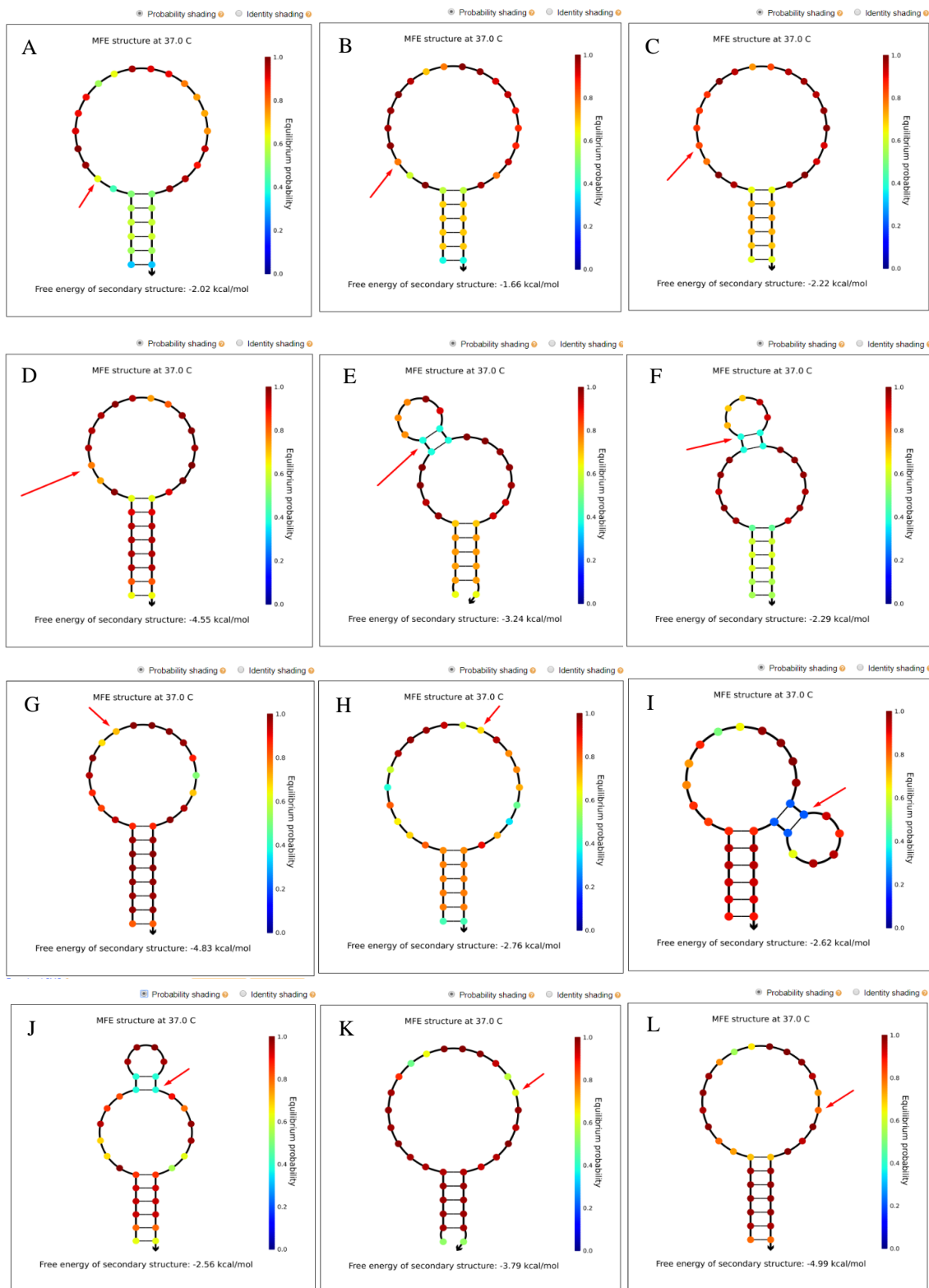


Figura 4.12- Estruturas de possíveis oligonucleotídeos silenciadores anti-codão13 de *KRAS*, correspondendo a permutações teóricas dos oligonucleotídeos silenciadores utilizados para futuros estudos de otimização de construção de sondas silenciadoras anti-*KRAS*, obtida através do NUPACK.

4.3.3. Caraterização dos Au-nanoconjugados

Tamanho, forma, estado de agregação, características de superfície, (...). Diversos estudos revelam como diferentes propriedades resultam em efeitos distintos aquando utilização, tornando o processo de caraterização dos Au-nanoconjugados importante.

Entre as ferramentas de caraterização mais comuns estão o TEM, SEM, DLS e UV-Vis; cada uma delas fornece um grau de informação elevado e diferente das outras, podendo assim essa informação ser complementada com a utilização das restantes ferramentas¹²⁷.

4.3.3.1. Caraterização UV-Vis

A espectroscopia UV-Vis é utilizada para medições de desvios na absorvância da ressonância plasmónica de superfície, fornecendo assim informações acerca da conjugação superficial e do estado de agregação. No entanto, poucas são as informações diretas sobre o tamanho das partículas¹²⁷. As AuNPs foram sintetizadas de forma a atingir um diâmetro final médio de 14 nm, tal como anteriormente descrito em diversos relatórios onde foram utilizadas abordagens *non-crosslinking*¹²⁸. A concentração molar foi calculada através da equação da lei de *Lambert-Beer* (Equação 3.1) para todas as AuNPs, embora o seu cálculo possa também ser um desafio devido à polidispersividade das mesmas, uma vez que de um lote para outro o tamanho e as dispersões do mesmo podem variar significativamente¹²⁹.

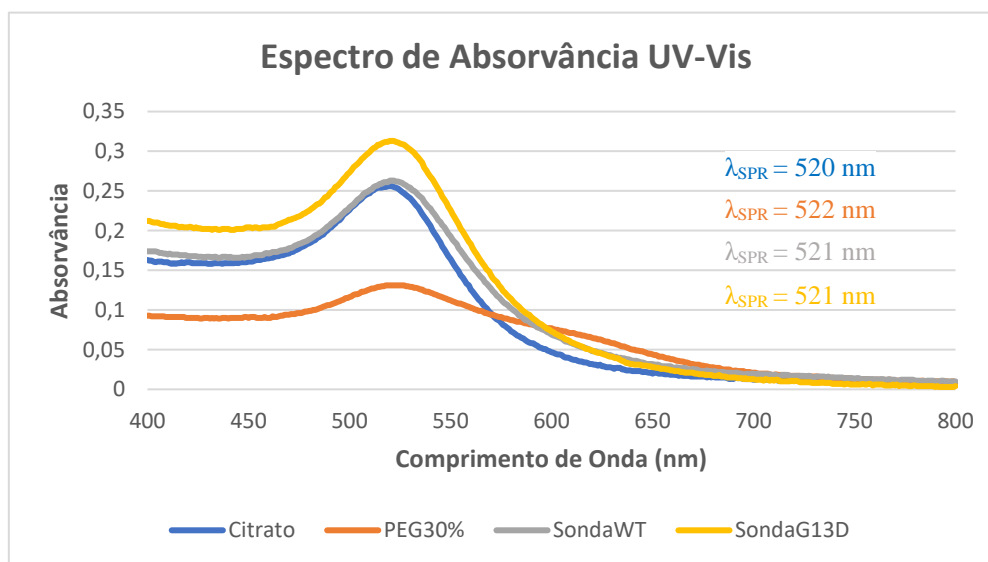


Figura 4.13- Espetros de absorvância UV-Vis dos sistemas de entrega em estudo (AuNP@citrato, AuNP@PEG, AuNP@PEG@WT e AuNP@PEG@G13D).

De acordo com a literatura, em soluções coloidais de AuNPs com diâmetros entre 5 e 30 nm observam-se bandas com o pico SPR centrado nos 520 nm, exibindo uma cor avermelhada¹³⁰. É importante notar o desvio químico do pico de absorvância após cada uma das funcionalizações realizadas (Figura 4.13). Este desvio é compatível com a existência de uma alteração do diâmetro

das AuNPs de funcionalização para funcionalização, indicando que as mesmas foram bem realizadas. A primeira funcionalização foi conseguida substituindo os iões de citrato que revestiam completamente as AuNPs por PEG-tiolado. No entanto, a funcionalização foi feita de forma a que apenas 30% da superfície das AuNPs ficassem revestidas com o polímero, podendo este ainda ficar deitado ao longo das mesmas ou esticado para o meio envolvente. Dependendo da homogeneidade da distribuição destes 30% de PEG e da sua conformação nas AuNPs, poderão existir nos restantes 70% da superfície das AuNPs iões citrato e/ou espaços por preencher. Aquando da segunda funcionalização, os espaços vazios e os iões citrato que poderiam restar da primeira funcionalização, foram preenchidos ou substituídos por ssDNA-tiolados, os quais tiveram eficiências de funcionalização de 52% e 46%, para as AuNP@PEG@WT e para as AuNP@PEG@G13D, respetivamente. Como para a funcionalização partiu-se de um rácio de 100:1 (oligo:AuNP), significa que em média metade da superfície das AuNPs ficou revestida com os ssDNA, a somar aos 30% de PEG previamente funcionalizados. As diferenças nos comprimentos dos diferentes revestimentos nas AuNPs, assim como as suas distribuições e conformações ao longo das mesmas, poderão estar na origem das AuNP@PEG apresentarem um pico SPR superior às AuNP@PEG@oligo, indicativo de um maior diâmetro.

4.3.3.2. Caraterização DLS

Após caraterização por espectroscopia UV-Vis, procedeu-se então à caraterização das AuNPs por DLS. Desta análise foi possível adquirir informações referentes ao seu diâmetro e distribuição. Esta técnica mede o movimento Browniano, o qual consiste no movimento aleatório das AuNPs resultante da sua colisão com as moléculas do solvente. A velocidade deste movimento depende do tamanho das partículas, da viscosidade do solvente e de uma temperatura estável, esta última para evitar a formação de correntes de convecção. As limitações desta técnica estão ligadas à sua incapacidade em medir concentrações e em resolver várias populações de partículas de tamanhos diferentes¹²⁷.

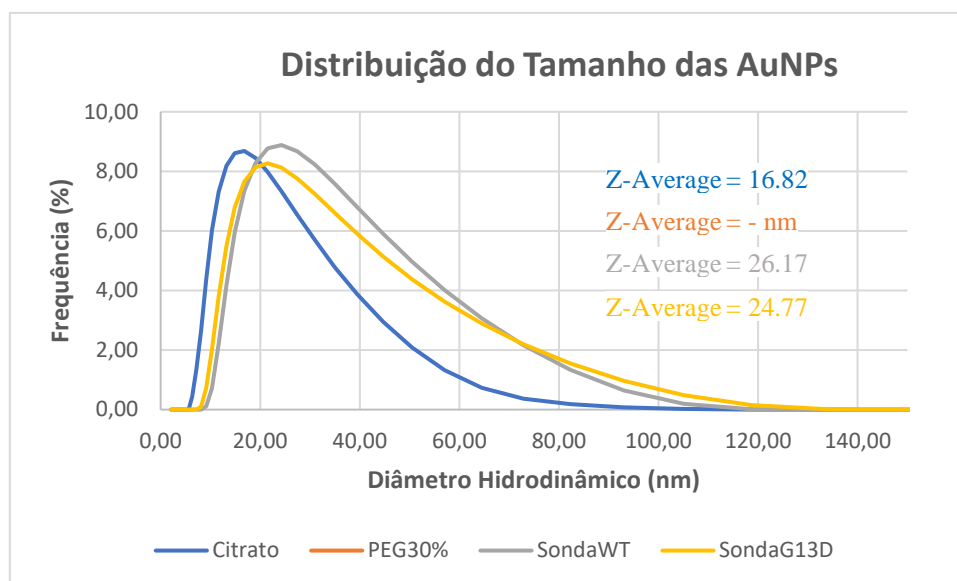


Figura 4.14- Caracterização DLS dos sistemas de entrega utilizados (AuNP@citrato, AuNP@PEG, AuNP@PEG@WT e AuNP@PEG@G13D).

Ao recorrer a esta técnica, não estamos a medir o diâmetro da partícula mas sim o seu diâmetro hidrodinâmico. Este inclui não só o diâmetro do núcleo da partícula, como também a área correspondente às estruturas superficiais e às interações com os iões do meio. Uma vez que para a experiência as amostras foram diluídas em água Milli-Q filtrada (deionizada, desprovida de iões), o aumento de 2,42 nm em relação ao tamanho teórico previamente calculado, verificado na figura 4.14, deve-se ao revestimento de citrato ao redor das AuNPs.

Na figura 4.14 podemos observar os diâmetros hidrodinâmicos obtidos para cada tipo de AuNPs, sendo visível o deslocamento da curva para a direita, indicando um aumento do seu tamanho após as funcionalizações. Após as funcionalizações efetuadas, o diâmetro das AuNP@PEG@WT e das AuNP@PEG@G13D médio verificado foi de 26,17 nm (+9,35) e de 24,77 nm (+7,95), respetivamente. Assumindo que a distância entre os pares de bases de dsDNA é de 0,34 nm (Watson e Crick, 1953)¹³¹ e sabendo que as sondas possuem 32 nucleotídeos (devido ao *hairpin*, apenas 16 se contabilizam para o efeito), o aumento esperado seria de 10,88 nm (5,44 nm para cada lado). Considerando que o revestimento de citrato é removido durante a funcionalização, a soma entre o núcleo de ouro calculado em 14,4 nm com os 10,88 nm resultaria em sondas com 25,28 nm. A diferença entre os valores esperados e os experimentais pode ser explicada devido ao tamanho do grupo tiol ser ignorado, ao facto do modelo de Watson e Crick se referir a dsDNA enquanto as sondas são ssDNA, e/ou devido à estrutura do próprio *hairpin* formado pelo oligonucleotídeo. Esta última poderá estar também na origem da diferença de tamanhos obtidos entre ambas as sondas sintetizadas. Tendo estes fatores em conta, o pico do gráfico, referente ao diâmetro mais frequente, encontra-se na zona esperada. No entanto, verificam-se AuNPs com diâmetros superiores a 40-60 nm, podendo estes corresponder possíveis agregações. A natureza da superfície e do polímero, bem como a concentração iónica do meio,

podem afetar a conformação do polímero, e consequentemente, alterar os valores do tamanho em vários nanómetros, podendo esta também ser uma justificação para o ocorrido.

O índice de polidispersividade (PI) é um parâmetro comumente utilizado aquando da caracterização da distribuição de tamanho das partículas, descrevendo o grau de não uniformidade de uma distribuição do tamanho de partículas¹³². Também conhecido como índice de heterogeneidade, o PI é adimensional e redimensionado, de modo que valores menores que 0,05 são vistos principalmente como padrões altamente monodispersos. Valores de PI superiores a 0,7 indicam que a amostra tem uma distribuição de tamanho de partículas muito ampla e que provavelmente não será adequada para ser analisada por DLS¹³³. Geralmente consideram-se partículas monodispersas quando o valor deste parâmetro é inferior a 0,3.

Tabela 4.2- Caracterização dos sistemas de entrega utilizados (AuNP@citrato, AuNP@PEG, AuNP@PEG@WT e AuNP@PEG@G13D) por UV-Vis e DLS.

	Pico SPR (nm)	Núcleo AuNP (nm)	Diâmetro Hidrodinâmico (nm)	PI
AuNPs	520	14,4	16,82	0,163
AuNP@PEG	522		-	-
AuNP@PEG@WT	521		26,17	0,356
AuNP@PEG@G13D	521		24,77	0,252

4.3.4. Teste de estabilidade

Os Au-nanoconjugados sintetizados e caracterizados serão utilizados em ensaios biológicos, onde serão internalizados pelas células e o seu efeito na expressão genética avaliado. Durante o processo de internalização, os Au-nanoconjugados são expostos a várias condições de pH, desde o pH 7,4 do citosol ao pH 6 presente nos endossomas. Desta forma, é necessário verificar se os Au-nanoconjugados serão estáveis nestas condições, ou se ocorrerá algum tipo de desnaturação ou agregação, inviabilizando o silenciamento pretendido. Para este efeito, foi realizado um pequeno estudo de estabilidade, onde os Au-nanoconjugados foram avaliados por espectroscopia UV-Vis em tampão fosfato, numa gama de pH 5 a pH 8 (Figura 4.15).

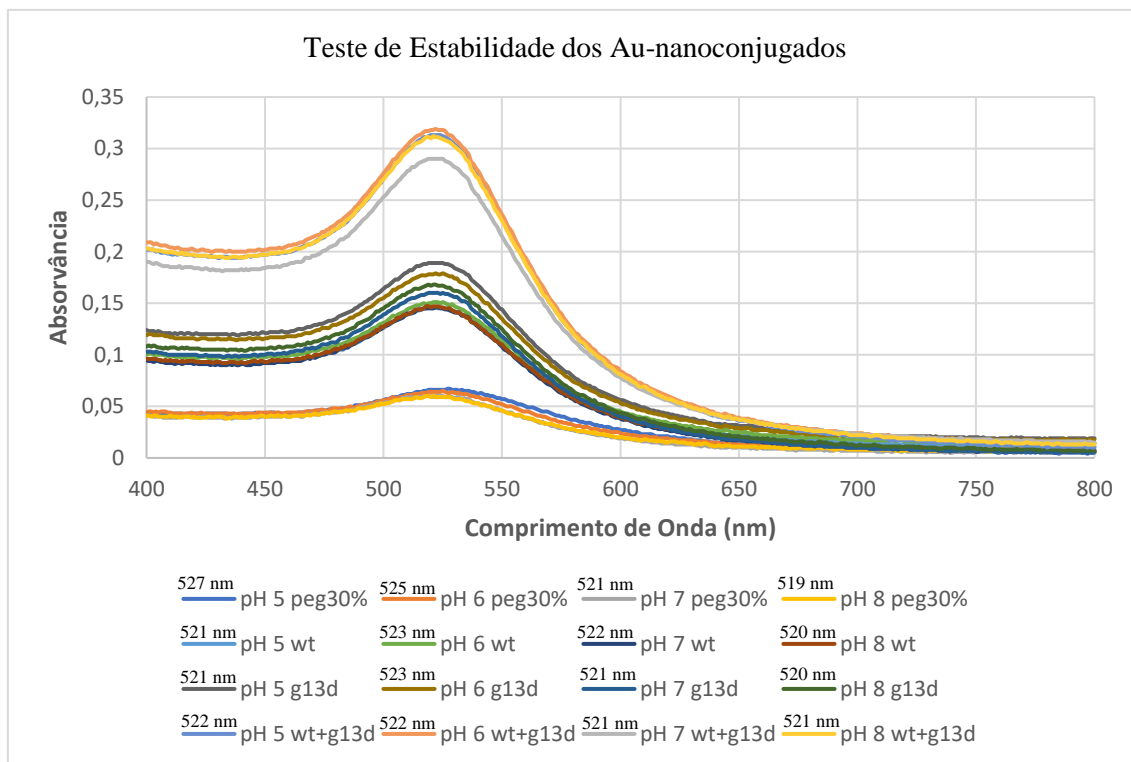


Figura 4.15- Teste de estabilidade dos sistemas de entrega utilizados (AuNP@citrato, AuNP@PEG, AuNP@PEG@WT e AuNP@PEG@G13D), em tampão fosfato, numa gama de pH 5 a pH 8.

O tampão fosfato é uma solução amplamente utilizada em pesquisas biológicas, pois para além de ajudar a manter um pH constante, as suas concentrações iónicas geralmente coincidem com as do corpo humano. De acordo com o gráfico da figura 4.15, é possível verificar a existência de desvios de cada um dos constructos nos diferentes pHs analisados. As AuNP@PEG sofrem um desvio do seu pico de absorvância de 528 nm a pH 5 para 519 nm a pH 8, possivelmente devido a uma alteração na conformação do PEG que reveste a sua superfície, no entanto, não a suficiente para as partículas agregarem, como foi o caso das AuNPs@citrato. Por outro lado, as AuNPs funcionalizadas com ssDNA variam menos o seu pico de absorvância, encontrando-se os seus extremos entre os 520 nm a pH 8 e 523 nm a pH 6. Embora em nenhum dos construtos em análise se tenha verificado agregação, pode observar-se que enquanto as AuNP@PEG têm tendência a diminuir o seu pico com o aumento do pH do meio envolvente, os Au-nanoconjugados tendem a manter os seus valores constantes, tanto para um mesmo pH como para os restantes pHs analisados. Este estudo revela a estabilidade existente dos Au-nanoconjugados utilizados no decorrer deste trabalho.

4.4. Avaliação da expressão de *KRAS*

Após uma primeira fase de descoberta das sequências a trabalhar, e de uma segunda fase de construção de Au-nanoconjugados específicos para o gene-alvo, podemos agora entrar numa

terceira fase, onde verificaremos que alterações na expressão génica obtemos. A quantificação dos níveis de expressão genética é uma ferramenta de pesquisa importante para entender sistemas biológicos¹³⁴.

Primeiramente será necessário desenhar e analisar os *primers* a utilizar. É fundamental que estes sejam específicos para a zona-alvo de *KRAS*, pois a análise da expressão genética será dependente dos mesmos. Os *primers* foram desenhados de acordo com os parâmetros discutidos em 7.3. Desenho de *primers*.

De forma a verificar se os *primers* desenhados amplificavam o cDNA na região pretendida, realizou-se um ensaio PCR onde 3 conjuntos de *primers* (FAxR, FBxR, FVxR) específicos para *KRAS* foram testados em 3 linhas celulares cancerígenas (HCT116, A549, A2780) nas quais este gene é expresso (Figura 4.16). A importância deste ensaio prende-se com a verificação da especificidade dos *primers* com a zona-alvo comparando os tamanhos teóricos de cada banda, em cada linha celular, por cada conjunto de *primers*, com o tamanho obtido experimentalmente.

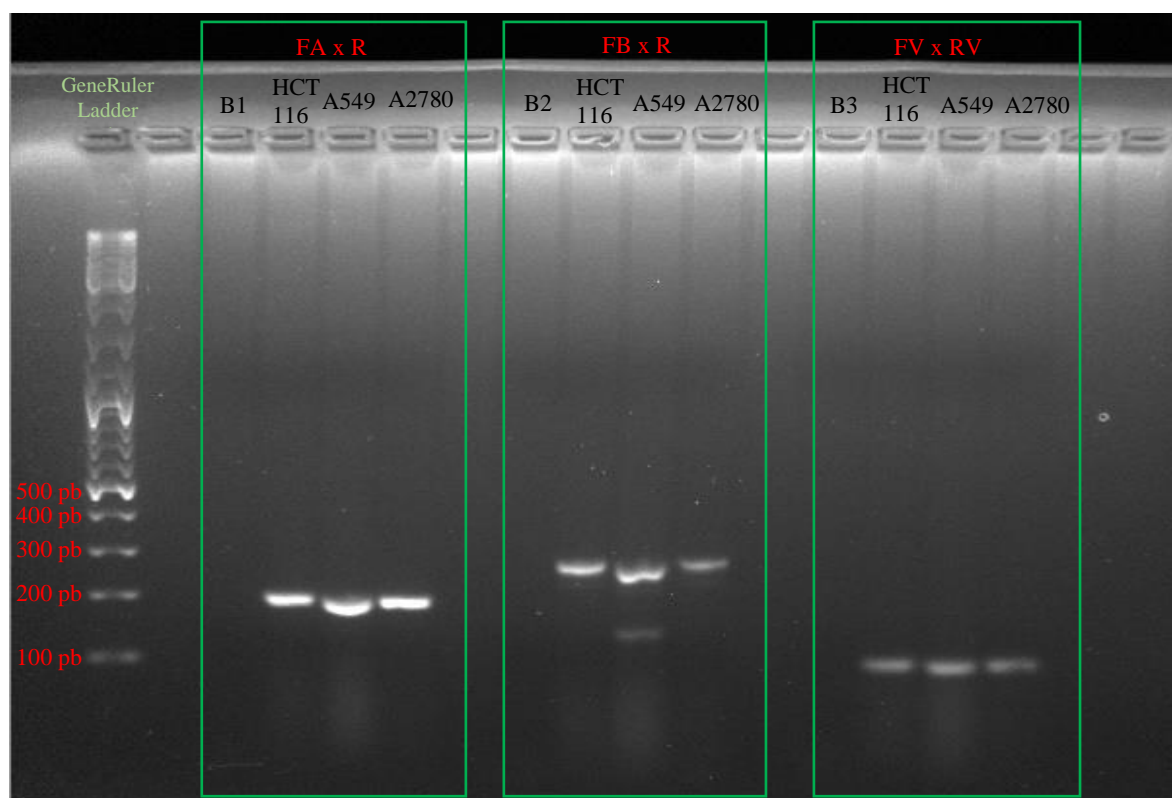


Figura 4.16- Eletroforese em 2% de gel de agarose (80 V, 2h12) efetuada para averiguar qual o par de *primers* a utilizar nos estudos de expressão genética por RT-qPCR (GelDoc). Teste a 3 conjuntos de *primers* diferentes (FAxR, FBxR e FvxR) em 3 linhas celulares distintas (HCT116, A549 e A2780). O marcador utilizado foi o GeneRuler Ladder mix.

No gel de agarose obtido (Figura 4.16), conseguimos observar uma amplificação em que o número de pares de bases (bp) observáveis no gel corresponde ao esperado, para cada um deles,

visto amplificarem amplicões de diferentes tamanhos, tal como pode ser verificado em 7.5. Sequências correspondentes aos testes de *primers* para RT-qPCR.

O primeiro conjunto de *primers* foi o que apresentou as bandas únicas mais intensas, demonstrando não só especificidade, como também um bom rendimento de amplificação. O produto deste conjunto tem também um tamanho semelhante ao produto obtido pelos *primers* a serem utilizados para alvejar o gene *housekeeping 18S* aquando do RT-qPCR. Esta informação permite que os resultados obtidos sejam comparáveis, não estando em causa um maior rendimento de amplificação de um dos genes devido a um dos amplicões ser muito maior que o outro. No segundo conjunto verificamos uma segunda banda na linha celular A549, podendo indicar uma inespecificidade ou uma possível contaminação. Do terceiro conjunto testado verificamos bandas únicas, no entanto pouco intensas. Desta forma o primeiro conjunto de *primers* foi escolhido para primeiramente sequenciar o amplicão, e seguidamente para as experiências de RT-qPCR.

Embora os cromatogramas das sequenciações referentes ao gDNA das linhas celulares HCT116 e HT29 (Figuras 4.4 e 4.5) já tenham sido previamente analisados, estes apenas nos deram informação acerca da existência ou ausência de mutações na zona-alvo. De forma a prosseguir na avaliação da alteração da expressão genética, é necessário sequenciar o cDNA sintetizado a partir do mRNA, produto da expressão, das linhas celulares em estudo (Figura 4.17).

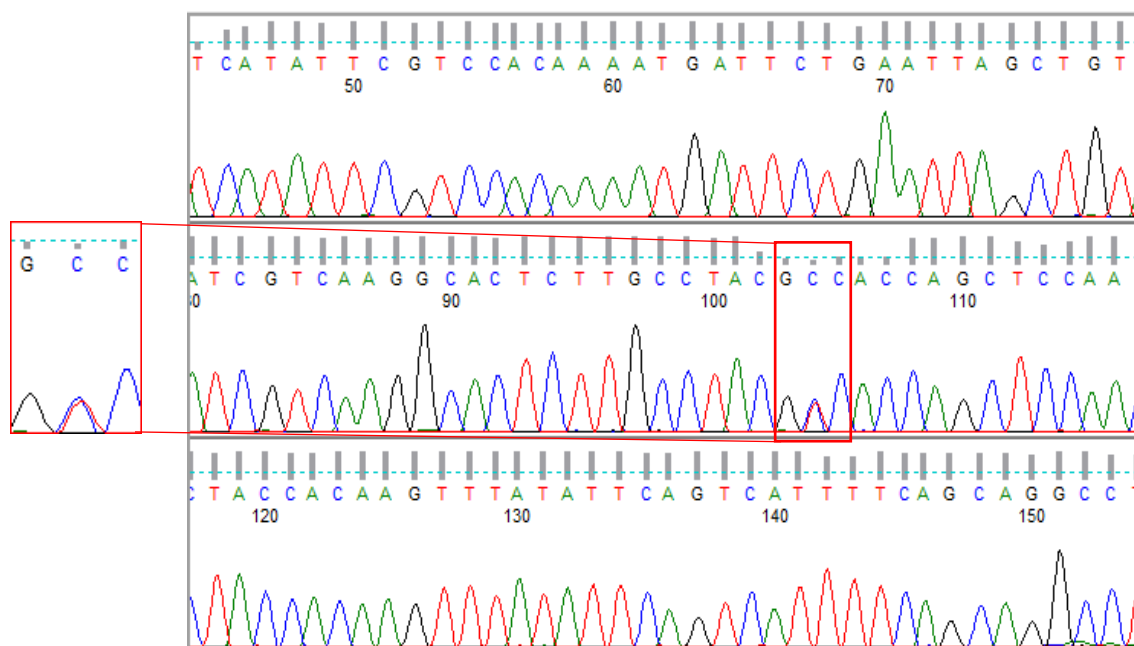


Figura 4.17 - Sequenciação Sanger realizada pela STABVIDA (Caparica, Portugal) das amostras de cDNA amplificadas correspondentes à linhagem celular tumoral HCT116.

Para a linha HT29, sendo homozigótica apenas expressa uma sequência de mRNA referente ao codão 13 de *KRAS*, no entanto, a linha celular HCT116 é heterozigótica, podendo expressar uma ou ambas as versões de mRNA, ou até mesmo em proporções distintas entre elas. Pela análise ao cromatograma presente na figura 4.17, conseguimos perceber que ambos os alelos

são expressos pela linha HCT116, em quantidades equiparáveis, apesar do “C” aparentar apresentar níveis de expressão mais elevados.

4.4.1. Silenciamento *KRAS* em HCT116

Sabendo a expressão genética de *KRAS* em HCT116 e HT29, e com as sondas específicas sintetizadas para alvejar o codão 13, tanto WT como mutado, são agora necessários realizar os ensaios biológicos onde as células serão expostas às sondas.

Primeiramente células da linhagem HCT116 foram semeadas em meio DMEM em placas de 24 poços, de forma a termos 1×10^5 células por poço. Nos poços que limitam a placa é adicionada água, de forma a manter a humidade e evitar evaporação do meio de cultura. Como referido anteriormente, estas linhas celulares são aderentes, sendo necessário esperar 24h para que adiram ao fundo dos poços e se adaptem ao novo microambiente previamente a poderem ser realizados ensaios biológicos com as mesmas. Estes ensaios baseiam-se na incubação das células em conjunto com as sondas específicas durante tempos compreendidos entre as 6h e as 18h, de modo a verificar o efeito que as sondas têm nas células ao longo do tempo (Figura 4.18).

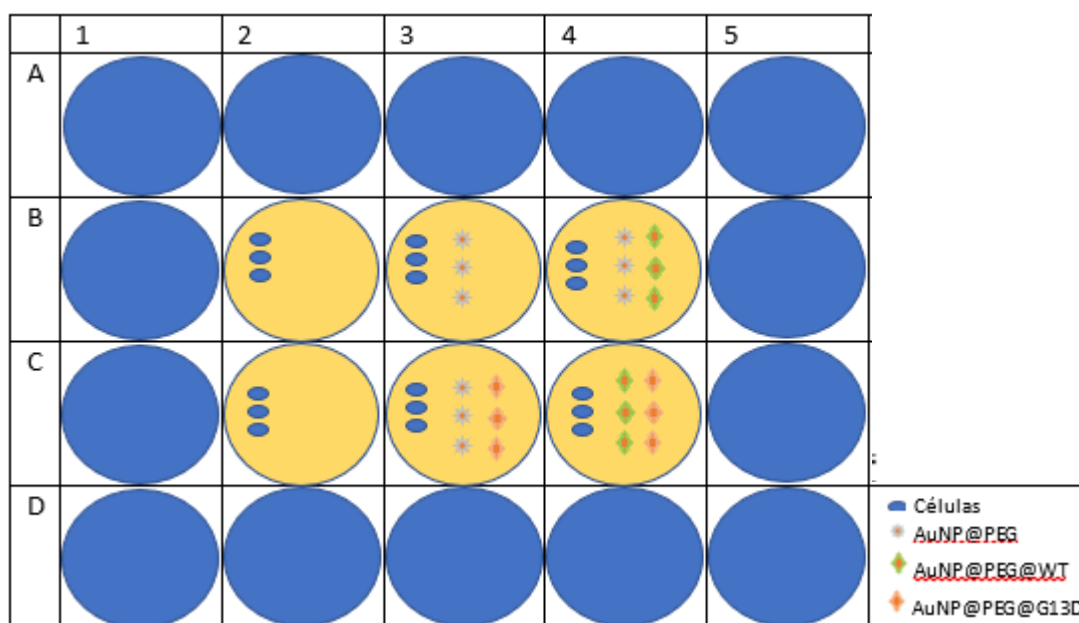


Figura 4.18- Esquematização dos ensaios celulares realizados em placas de 24 poços. Os círculos grandes a azul simbolizam os poços com água, enquanto que os círculos a amarelo simbolizam os poços com meio DMEM.

A figura 4.18 esquematiza a distribuição do ensaio para um único *time-point*. Tendo sido comprovada a heterozigotia das células HCT116 temos: 1 poço (C4) onde células desta linhagem foram expostas a ambas as sondas específicas, prevendo-se teoricamente um silenciamento de 100%; 1 poço onde as células foram expostas a apenas uma das sondas, individualmente (B4 e C3), onde se teve de compensar a concentração de ouro relativamente à utilizada no poço C4 com

AuNP@PEG, prevendo-se um silenciamento de 50%, correspondente ao alelo específico que a sonda alvejaria; 1 poço onde as células foram expostas apenas a AuNP@PEG (B3) que serviu de controlo positivo, de forma a contabilizar qualquer tipo de resposta metabólica por parte das células à presença das AuNPs, não sendo previsto que ocorra nenhum silenciamento; e por último 2 poços onde as células crescem sem qualquer tratamento (B2 e C2 - controlos negativos). Assim que o tempo de incubação foi atingido, o ensaio biológico foi interrompido e iniciou-se o processo de extração e quantificação de RNA total presente em cada poço.

Após quantificação do RNA total extraído a partir de cada poço, as amostras que apresentem bons valores para cada um dos rácios 260/230 e 260/280 prosseguem para síntese de cDNA e em seguida para ensaios de RT-qPCR, onde o efeito que as sondas tiveram nas células, a cada *time-point*, poderá ser avaliado.

Medindo a quantidade de RNA celular é possível determinar a expressão de determinado gene de interesse. Contudo, para a maioria dos genes, os seus níveis de expressão alteram-se drasticamente de gene para gene, de célula para célula, ou durante as condições experimentalmente testadas¹³⁵. O RT-qPCR é o método preferido a ser utilizado quando o assunto diz respeito a medições de expressão genética devido à sua sensibilidade e reprodutibilidade^{134,135}. No entanto, apesar das vantagens existem também desvantagens que afetam a interpretação dos resultados, como por exemplo: a extração de quantidades iguais de RNA não degradado de cada amostra; uma eficiência consistente da transcriptase reversa, resultando em quantidades iguais de cDNA em todas as amostras; especificidade do conjunto de *primers* utilizados; ou até mesmo a presença de inibidores nas amostras¹³⁶. Assim, de forma a obter resultados confiáveis de RT-qPCR é crucial que seja feita uma normalização dos resultados obtidos com os chamados *housekeeping genes*, cuja expressão é estável, não sendo afetada pelo tratamento em estudo¹³⁴. Estes são geralmente genes de manutenção celular que regulam funções celulares básicas e comuns a “todas” as células, podendo assim funcionar como controlos internos da expressão genética¹³⁷. No presente estudo, de forma a avaliar uma possível alteração de expressão de *KRAS* utilizou-se o gene *18S* como *housekeeping gene* para a normalização, pois tem sido um gene amplamente utilizado noutros trabalhos onde o foco é precisamente a expressão genética, e o tamanho do amplicão resultante do conjunto de *primers* existentes para o mesmo não difere muito ao tamanho do amplicão resultante do conjunto de *primers* utilizados para *KRAS*, como anteriormente referido.

Um método amplamente utilizado para apresentar os níveis de expressão genética relativa é o método comparativo de CT, também conhecido como método $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Este método assume que a eficiência do PCR é de 1, e que a eficiência do PCR do gene alvo é semelhante ao do gene de controlo interno¹³⁵. Tendo isto em conta, os dados do RT-qPCR foram analisados por este método, adaptando as equações 3.3, 3.4 e 3.5 presentes em 3.2.4.5 *Real-Time quantitative PCR*, onde a

expressão genética relativa é conseguida ao quantificar o gene de interesse (*KRAS*) relativamente ao gene de controlo interno (*18S*), normalizando à condição controlo (AuNP@PEG):

$$\Delta Ct = Ct_{KRAS} - Ct_{18S} \quad \text{Equação 4.1}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{\text{Au-nanoconjugados}} - \Delta Ct_{\text{AuNP@PEG}} \quad \text{Equação 4.2}$$

$$2^{-\Delta\Delta Ct} \quad \text{Equação 4.3}$$

Desta forma, e considerando a expressão de AuNP@PEG como 1 (controlo da expressão de *KRAS* na presença de ouro, sem alvo concreto), foi possível traçar um perfil da expressão genética de *KRAS*, tentando perceber: 1) a que *time-point* se obtém um máximo de silenciamento e 2) a que *time-point* a expressão é totalmente recuperada. Através de uma análise ao gráfico da figura 4.19 conseguimos perceber a expressão genética de *KRAS* ao longo do tempo.

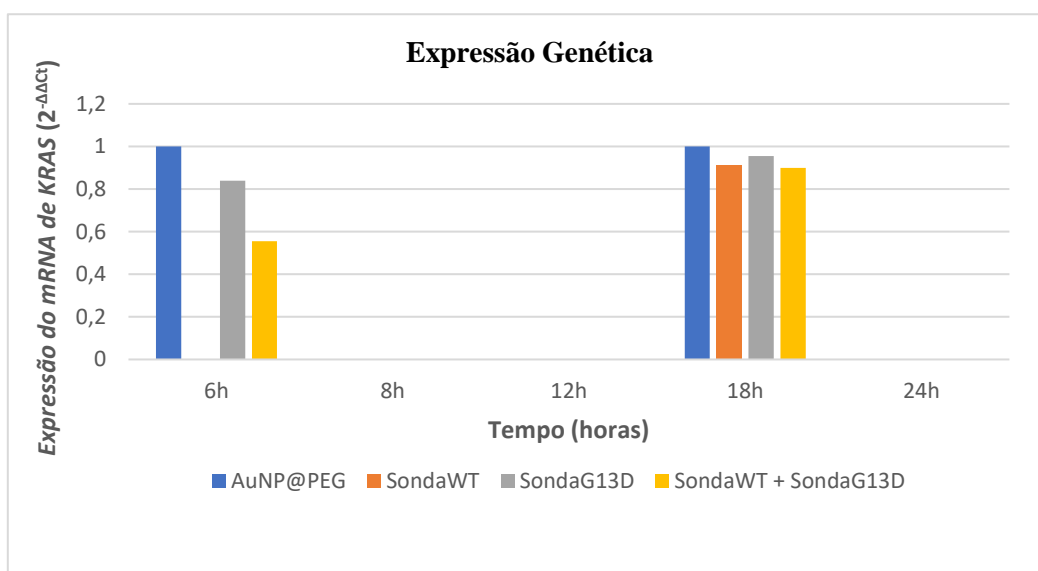


Figura 4.19- Alteração da expressão genética relativa de *KRAS* após exposição de células tumorais HCT116 aos sistemas de entrega em estudo (AuNP@citrato, AuNP@PEG, AuNP@PEG@WT e AuNP@PEG@G13D).

De acordo com as experiências efetuadas até à data (Figura 4.19), verifica-se a obtenção de silenciamento genético às 6h de incubação, e uma recuperação da expressão genética quase que na sua totalidade às 18h de incubação, para esta linha celular. Os dados mostram um silenciamento eficiente gerado pelos Au-nanoconjugados desenhados, aparentando o silenciamento das duas sondas utilizadas em conjunto ser a soma de ambas, quando utilizadas individualmente. Esta observação fortalece a hipótese da especificidade de cada uma das sondas desenhadas, as quais mesmo diferindo em apenas 1 nucleotídeo entre elas, reconhecem unicamente o mRNA respetivo.

O maior silenciamento conseguido até à data corresponde a uma supressão de 45% da expressão total, sendo verificada aquando da utilização de ambas as sondas com 6h de incubação.

De notar que a linha celular até então utilizada é heterozigótica, expressando ambos os alelos em quantidades semelhantes (Figuras 4.4 e 4.17) mas não iguais, podendo ser esta uma possível justificação para a pequena variação de silenciamento entre ambas as sondas. No entanto, esta hipótese apenas poderá ser devidamente esclarecida correlacionando esta informação com dados de futuras experiências para a linha homozigótica (Figura 4.5), pois só assim poderemos observar qual o silenciamento com a sonda específica anti-*KRAS* WT total, e se é obtido silenciamento com a sonda específica anti-*KRAS* G13D.

Diversas têm sido as estratégias utilizadas com o objetivo de silenciar *KRAS*. Wang *et al.* (2012)¹³⁸ obteve silenciamentos da expressão de *KRAS* de 23% e 69% após 24h nas suas experiências, onde células NRK-49F foram transfectadas com ASOs (200 nmol/L). A equipa de Strand *et al.* (2019)⁴¹ conseguiu uma redução na expressão do mRNA de *KRAS* de 55-70% *in vitro* em células tumorais KPC-1 (pancreática) e CT26 (colorretal) após 24h de tratamento utilizando *KRAS*-siRNA conjugado com nanopartículas peptídicas. Bao *et al.* (2015)¹¹⁶ observaram um silenciamento superior a 80% ao avaliarem os níveis de mRNA após 48h incubação de células MGC-803 (*gastric cancer cells*) aquando a utilização de uma concentração de *nanobeacons* anti-*KRAS* de 50 nM. Esta última, descreve a estratégia mais próxima à utilizada na presente tese, recorrendo precisamente a oligonucleotídeos *antisense* específicos para *KRAS* funcionalizados em AuNP@PEG. No entanto, das diversas concentrações utilizadas pelos autores, aquela que obteve melhores resultados de silenciamento corresponde a uma concentração 2,5x superior à utilizada na presente tese. Assim, acredito que num processo de otimização da concentração das sondas aquando dos ensaios celulares, se poderão obter valores superiores no silenciamento de *KRAS*.

De acordo com a bibliografia, é de notar a existência de recuperação da expressão após determinados tempos de incubação. Esta, poderá estar relacionada a uma degradação do oligonucleotídeo e/ou ao crescimento celular que naturalmente ocorre durante o período de incubação¹³⁹, principalmente nos *time-points* mais longos.

4.4.2. Viabilidade celular

De modo a poder avaliar *in vitro* o potencial citotóxico dos Au-nanoconjugados em estudo, foram realizados ensaios de viabilidade celular na linha tumoral HCT116, recorrendo ao reagente 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio (MTS). Este ensaio baseia-se na capacidade que as células viáveis possuem, devido à ação de desidrogenases mitocondriais, em reduzir o reagente de MTS e, consequentemente, formar formazano como produto final. Este ensaio permite, desta forma, medir a atividade metabólica das células nas diferentes condições em estudo. A atividade celular será assim proporcional à quantidade de formazano produzido pelas células, após exposição aos Au-nanoconjugados.

De acordo com a figura 4.20, nota-se uma diminuição de ~20% quando as células foram expostas durante 6h à SondaWT e à SondaG13D, individualmente, relativamente ao controlo AuNP@PEG. Estes dados vão de encontro aos estudos de expressão genética discutidos anteriormente, onde após 6h de exposição se observa um maior silenciamento de *KRAS*. No caso das AuNP@PEG a viabilidade mantém-se nos 100%, sugerindo que a redução da viabilidade celular obtida se deveu realmente à presença do oligonucleotídeo nos nanoconjugados (SondaWT e SondaG13) e da sua ação sobre o mRNA de *KRAS*. No entanto, quando ambas as sondas foram utilizadas em conjunto verificou-se um aumento de 20% da viabilidade celular. Estes ensaios deverão ser repetidos de forma a confirmar estes resultados, pois embora se verifique um silenciamento quando ambas as sondas são utilizadas individualmente, o que se obteve para a sua utilização conjunta vai em contra os resultados de expressão genética anteriormente obtidos, onde o silenciamento foi máximo aquando da utilização de ambas as sondas, em conjunto.

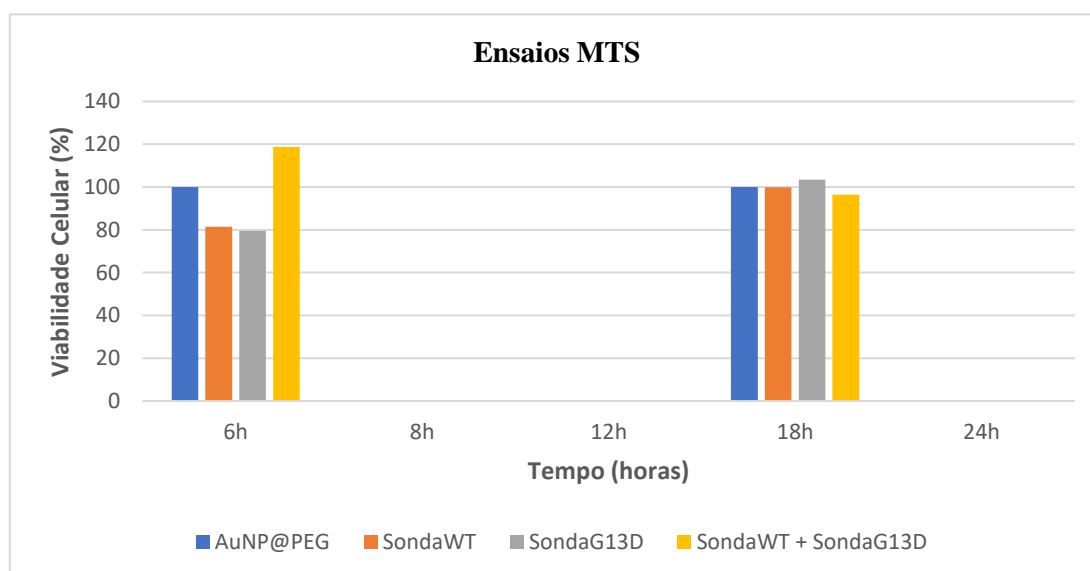


Figura 4.20- Ensaios MTS relativos à viabilidade celular da linhagem tumoral HCT116 após exposição aos sistemas de entrega em estudo (AuNP@citrato, AuNP@PEG, AuNP@PEG@WT e AuNP@PEG@G13D). Os valores da viabilidade celular foram normalizados em relação ao veículo controlo (AuNP@PEG).

Analisando a figura 4.20 verifica-se também uma manutenção da viabilidade celular após 18h de exposição nas diferentes condições estudadas. Estes resultados vão de encontro aos anteriormente obtidos nos estudos de expressão genética para este tempo de exposição, sugerindo uma recuperação da expressão genética praticamente total após 18h de exposição das células aos Au-nanoconjugados. A durabilidade do efeito de silenciamento induzido pelos nanoconjugados pode estar associada 1) ao aumento no número de células após as 18h de exposição, distorcendo a razão célula:Au-nanoconjugado, resultando, uma vez que o silenciamento obtido não foi total, num *KRAS* constitutivamente ativo, pelo menos numa porção das células presentes nos poços do ensaio, resultando num desenvolvimento e proliferação das mesmas, ou 2) a uma degradação dos

oligonucleotídeos a partir de determinado tempo de incubação, hipótese já verificado em estudos anteriores.

CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

5. Conclusões e Perspetivas Futuras

O interesse em *KRAS* nasceu da observação, em trabalhos prévios, de uma compensação por parte deste proto-oncogene em vias de desenvolvimento de células tumorais. Assim, procurámos utilizar este sistema de forma a, numa primeira fase: perceber se era possível silenciar a sua expressão e compreender quais os mecanismos que lhe estão associados; e, numa fase mais avançada, confirmar que o caminho no combate ao cancro passa por um tratamento personalizado tendo em consideração o código genético dos pacientes. Este estudo foi conseguido devido à construção de Au-nanoconjugados direcionados às mutações específicas presentes nas linhagens de células tumorais utilizadas (HCT116 e HT29).

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se o sucesso na redução da expressão genética de *KRAS*, tanto selvagem (WT) quanto mudado (p.G13D), tendo o máximo de silenciamento sido de 45% após 6h de exposição das células a ambas as sondas (SondaWT e SondaG13D), em simultâneo. Este silenciamento aparenta também ser a soma da utilização de ambas as sondas, em separado. No entanto, a recuperação da expressão genética parece ser totalmente obtida após as 18h de incubação, podendo esta dever-se a dois fatores: crescimento celular, distorcendo a razão célula:Au-nanoconjugado; ou a uma degradação dos oligonucleotídeos dentro das células após determinado tempo de incubação. Estudos de viabilidade celular forneceram também informações importantes, demonstrando que os silenciamentos obtidos nos estudos de expressão genética se deveram, de facto, a um silenciamento conseguido na expressão de *KRAS*, e não à morte celular dessa percentagem correspondente. Tal como realizado para os restantes genes já estudados com este sistema, este foi apenas um primeiro passo na perceção do impacto do mesmo em *KRAS*. Um próximo passo passará por estudos de otimização do sistema para o gene em causa: otimização das concentrações de oligonucleotídeos utilizadas; curvas de silenciamento para diferentes condições; estudos noutras linhagens celulares para dar força à terapia personalizada; entre outros. Estudos futuros envolverão, também, a conjugação com outras condições, por exemplo, a utilização de lipossomas para um aumento da captação celular, estudos de hipertermia, entre outros.

BIBLIOGRAFIA

6. Bibliografia

1. Sender R, Fuchs S, Milo R. Revised Estimates for the Number of Human and Bacteria Cells in the Body. *PLoS Biol.* 2016;14(8). doi:10.1371/journal.pbio.1002533
2. Weinberg RA. *The Biology of Cancer*. 2nd ed. W.W. Norton; 2013. <https://books.google.pt/books?id=MzMmAgAAQBAJ>.
3. Bertram J. The molecular biology of cancer. *Mol Aspects Med.* 2001;21:167-223. doi:10.1016/S0098-2997(00)00007-8
4. Pecorino L. *Molecular Biology of Cancer: Mechanisms, Targets, and Therapeutics.*; 2016. https://books.google.pt/books?hl=pt-PT&lr=&id=KbvyDwAAQBAJ&oi=fnd&pg=PP1&dq=Pecorino,+Lauren.+2012.+%22Molecular+Biography+of+Cancer:+Mechanisms,+Targets,+and+Therapeutics.%22+Oxford+university+press.&ots=z4Ui40kzsY&sig=7cgUxqfeTI3J8ruxF6-_mj3QTcQ&redir_esc.
5. Ruddon RW. *Cancer Biology*. Oxford University Press; 2007.
6. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018;68(6):394-424. doi:10.3322/caac.21492
7. International Agency for Research on Cancer. Population fact sheets Portugal - WHO. 2018;270:1-2. <https://gco.iarc.fr/today/data/factsheets/populations/620-portugal-fact-sheets.pdf>.
8. Nickle T, Barrette-Ng I. Mutagens and Carcinogens. 2020. <https://chem.libretexts.org/@go/page/4168>.
9. Irigaray P, Newby JA, Clapp R, et al. Lifestyle-related factors and environmental agents causing cancer: An overview. *Biomed Pharmacother.* 2007;61(10):640-658. doi:10.1016/j.biopha.2007.10.006
10. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Biological agents. Volume 100 B. A review of human carcinogens. *IARC Monogr Eval Carcinog risks to humans.* 2012;100(Pt B):1-441. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23189750>.
11. Fidler MM, Bray F, Soerjomataram I. The global cancer burden and human development: A review. *Scand J Public Health.* 2018;46(1):27-36. doi:10.1177/1403494817715400
12. Marant-Micallef C, Shield KD, Vignat J, et al. The risk of cancer attributable to diagnostic medical radiation: Estimation for France in 2015. *Int J Cancer.* 2019;144(12):2954-2963. doi:10.1002/ijc.32048
13. Forouzanfar MH, Afshin A, Alexander LT, et al. Global, regional, and national comparative risk assessment of 79 behavioural, environmental and occupational, and metabolic risks or clusters of risks, 1990–2015: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. *Lancet.* 2016;388(10053):1659-1724. doi:10.1016/S0140-6736(16)31679-8
14. Berman JJ. Tumor classification: Molecular analysis meets Aristotle. *BMC Cancer.* 2004;4:1-9. doi:10.1186/1471-2407-4-10
15. Lowe D. *General Pathology Vivas*. (Cambridge University Press 2001, ed.). Greenwich Medical Media; 2001. <https://books.google.pt/books?id=xiHcyR-BHeQC>.
16. *Dorland's Illustrated Medical Dictionary*. 29th ed. Philadelphia : Saunders; 2000. https://archive.org/details/trent_0116404640520/page/1038/mode/2up.
17. Abbas Z, Rehman S. An Overview of Cancer Treatment Modalities. In: *Neoplasms*. InTech; 2018. doi:10.5772/intechopen.76558
18. Kang H, O'Connell JB, Leonardi MJ, Maggard MA, McGory ML, Ko CY. Rare tumors of the colon and rectum: a national review. *Int J Colorectal Dis.* 2006;22(2):183-189. doi:10.1007/s00384-006-0145-2
19. Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al. E, ed. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th ed. Hamilton: BC Decker; 2003. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK12354/>.
20. Eddy DM. Screening for Colorectal Cancer. *Ann Intern Med.* 1990;113(5):373. doi:10.7326/0003-4819-113-5-373
21. Fleming M, Ravula S, Tatishchev SF, Wang HL. Colorectal carcinoma: Pathologic aspects. *J Gastrointest Oncol.* 2012;3(3):153-173. doi:10.3978/j.issn.2078-6891.2012.030
22. Tomlinson I, Ilyas M, Johnson V, et al. A comparison of the genetic pathways involved in the pathogenesis of three types of colorectal cancer. *J Pathol.* 1998;184(2):148-152. doi:10.1002/(SICI)1096-9896(199802)184:2<148::AID-PATH986>3.0.CO;2-M
23. Baba AI, Cătoi C. Tumor cell morphology. In: *Comparative Oncology*. The Publishing House of the Romanian Academy; 2007. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9553/>.
24. Berenblum I. Sequential aspects of chemical carcinogenesis: skin. In: *Cancer. A Comprehensive Treatise*. Springer; 1975:323-344.

25. Haschek WM, Rousseaux CG, Wallig MA, Bolon B, Ochoa R. *Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicologic Pathology*. Academic Press; 2013.
26. Croce CM. Oncogenes and cancer. *N Engl J Med*. 2008;358(5):502-511.
27. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell*. 2000;100(1):57-70. doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9
28. El-Aouar Filho RA, Nicolas A, De Paula Castro TL, et al. Heterogeneous Family of Cyclomodulins: Smart Weapons That Allow Bacteria to Hijack the Eukaryotic Cell Cycle and Promote Infections. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7(MAY):1-17. doi:10.3389/fcimb.2017.00208
29. Hustedt N, Durocher D. The control of DNA repair by the cell cycle. *Nat Cell Biol*. 2017;19(1):1-9. doi:10.1038/ncb3452
30. Giacinti C, Giordano A. RB and cell cycle progression. *Oncogene*. 2006;25(38):5220-5227. doi:10.1038/sj.onc.1209615
31. Pierotti MA, Sozzi G, Croce CM. Mechanisms of oncogene activation. *Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, al Holland-Frei Cancer Med 6th*. 2003.
32. Velculescu VE, El-Deiry WS. Biological and clinical importance of the p53 tumor suppressor gene. *Clin Chem*. 1996;42(6):858-868. doi:10.1093/clinchem/42.6.858
33. Abeloff MD, Armitage JO, Niederhuber JE, Kastan MB, McKenna WG. *Abeloff's Clinical Oncology E-Book*. Elsevier Health Sciences; 2008.
34. Brierley JD, Gospodarowicz MK, Wittekind C. *TNM Classification of Malignant Tumours*. 8th ed. (James D. Brierley, Mary K. Gospodarowicz CW, ed.). John Wiley & Sons; 2007. <https://books.google.pt/books?id=642GDQAAQBAJ>.
35. Amin MB, Greene FL, Edge SB, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017;67(2):93-99. doi:10.3322/caac.21388
36. O'Sullivan B, Brierley J, Byrd D, et al. The TNM classification of malignant tumours—towards common understanding and reasonable expectations. *Lancet Oncol*. 2017;18(7):849-851. doi:10.1016/S1470-2045(17)30438-2
37. Kamp MA, Dibué-Adjei M, Cornelius JF, et al. Is it all a matter of size? Impact of maximization of surgical resection in cerebral tumors. *Neurosurg Rev*. 2018;42(4):835-842. doi:10.1007/s10143-018-0963-z
38. Boeker M, França F, Bronsert P, Schulz S. TNM-O: ontology support for staging of malignant tumours. *J Biomed Semantics*. 2016;7(1):64. doi:10.1186/s13326-016-0106-9
39. Aitken JF, DR Y, AS M, et al. Childhood cancer staging for population registries according to the Toronto Childhood Cancer Stage Guidelines. *Cancer Councl Queensl Cancer Aust Brisbane, Aust*. 2017:1-64. <https://cancerqld.blob.core.windows.net/content/docs/childhood-cancer-staging-for-population-registries.pdf>.
40. Prior IA, Lewis PD, Mattos C. A comprehensive survey of ras mutations in cancer. *Cancer Res*. 2012;72(10):2457-2467. doi:10.1158/0008-5472.CAN-11-2612
41. Strand MS, Krasnick BA, Pan H, et al. Precision delivery of RAS-inhibiting siRNA to KRAS driven cancer via peptide-based nanoparticles. *Oncotarget*. 2019;10(46):4761-4775. doi:10.18632/oncotarget.27109
42. Cox AD, Der CJ. Ras history: The saga continues. *Small GTPases*. 2010;1(1):2-27. doi:10.4161/sgtp.1.1.12178
43. Waddell N, Pajic M, Patch AM, et al. Whole genomes redefine the mutational landscape of pancreatic cancer. *Nature*. 2015;518(7540):495-501. doi:10.1038/nature14169
44. Salianni M, Jalal R, Ahmadian MR. From basic researches to new achievements in therapeutic strategies of KRAS-driven cancers. *Cancer Biol Med*. 2019;16(3):435-461. doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2018.0530
45. Schubbert S, Shannon K, Bollag G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7(4):295-308. doi:10.1038/nrc2109
46. Brand TM, Wheeler DL. KRAS mutant colorectal tumors. *Small GTPases*. 2012;3(1):34-39. doi:10.4161/sgtp.18751
47. Boguski MS, McCormick F. Proteins regulating Ras and its relatives. *Nature*. 1993;366(6456):643-654. doi:10.1038/366643a0
48. Eser S, Schnieke A, Schneider G, Saur D. Oncogenic KRAS signalling in pancreatic cancer. *Br J Cancer*. 2014;111(5):817-822. doi:10.1038/bjc.2014.215
49. Douillard J-Y, Siena S, Cassidy J, et al. Randomized, Phase III Trial of Panitumumab With Infusional Fluorouracil, Leucovorin, and Oxaliplatin (FOLFOX4) Versus FOLFOX4 Alone As First-Line Treatment in Patients With Previously Untreated Metastatic Colorectal Cancer: The

- PRIME Study. *J Clin Oncol*. 2010;28(31):4697-4705. doi:10.1200/JCO.2009.27.4860
50. Nakhaei-Rad S, Haghighi F, Nouri P, et al. Structural fingerprints, interactions, and signaling networks of RAS family proteins beyond RAS isoforms. *Crit Rev Biochem Mol Biol*. 2018;53(2):130-156. doi:10.1080/10409238.2018.1431605
51. Vasan N, Boyer JL, Herbst RS. A RAS Renaissance: Emerging Targeted Therapies for KRAS-Mutated Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*. 2014;20(15):3921-3930. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1762
52. Cox AD, Der CJ, Philips MR. Targeting RAS Membrane Association: Back to the Future for Anti-RAS Drug Discovery? *Clin Cancer Res*. 2015;21(8):1819-1827. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-3214
53. Martín-Gago P, Fansa EK, Wittinghofer A, Waldmann H. Structure-based development of PDE δ inhibitors. *Biol Chem*. 2017;398(5-6):535-545. doi:10.1515/hsz-2016-0272
54. Narla G, Sangodkar J, Ryder CB. The impact of phosphatases on proliferative and survival signaling in cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2018;75(15):2695-2718. doi:10.1007/s00018-018-2826-8
55. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001;2(2):127-137. doi:10.1038/35052073
56. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*. 2007;26(22):3291-3310. doi:10.1038/sj.onc.1210422
57. Malumbres M, Barbacid M. RAS oncogenes: the first 30 years. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(6):459-465. doi:10.1038/nrc1097
58. Downward J. Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 2003;3(1):11-22. doi:10.1038/nrc969
59. Normanno N, Tejpar S, Morgillo F, De Luca A, Van Cutsem E, Ciardiello F. Implications for KRAS status and EGFR-targeted therapies in metastatic CRC. *Nat Rev Clin Oncol*. 2009;6(9):519-527. doi:10.1038/nrclinonc.2009.111
60. Guerrero I, Casanova I, Farré L, Mazo A, Capellà G, Mangués R. K-ras codon 12 mutation induces higher level of resistance to apoptosis and predisposition to anchorage-independent growth than codon 13 mutation or proto-oncogene overexpression. *Cancer Res*. 2000;60(23):6750-6756. <https://cancerres.aacrjournals.org/content/60/23/6750.short>.
61. Stolze B, Reinhart S, Bullinger L, Fröhling S, Scholl C. Comparative analysis of KRAS codon 12, 13, 18, 61 and 117 mutations using human MCF10A isogenic cell lines. *Sci Rep*. 2015;5(1):8535. doi:10.1038/srep08535
62. Tejpar S, Bokemeyer C, Celik I, Schlichting M, Sartorius U, Van Cutsem E. Influence of KRAS G13D mutations on outcome in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC) treated with first-line chemotherapy with or without cetuximab. *J Clin Oncol*. 2011;29(15_suppl):3511-3511. doi:10.1200/jco.2011.29.15_suppl.3511
63. DeVita Jr. V, Rosenberg SA, Hellman S. *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins Publishers; 2001. <https://oncousd.files.wordpress.com/2014/09/cancer-principles-and-practice-of-oncology-6e.pdf>.
64. Beil DR, Wein LM. Sequencing Surgery, Radiotherapy and Chemotherapy: Insights from a Mathematical Analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2002;74(3):279-286. doi:10.1023/A:1016357311845
65. Ms. Snehal D. Jadhav, Mr. Jeevan R. Rajguru, Ms. Hina U. Momin DMKS. Gene Therapy- Challenges & Success. *Int J Trend Sci Res Dev*. 2020;4(3):870-874.
66. Mustafa M, Salih AF, Iizam EM, et al. Gene therapy : Recent Development , Benefits and Pitfall. *Iosr-Jdms*. 2017;16(11):89-95. doi:10.9790/0853-1611128995
67. Kaji EH. Gene and Stem Cell Therapies. *JAMA*. 2001;285(5):545. doi:10.1001/jama.285.5.545
68. Moding EJ, Kastan MB, Kirsch DG. Strategies for optimizing the response of cancer and normal tissues to radiation. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12(7):526-542. doi:10.1038/nrd4003
69. Yeo SK, Guan J-L. Breast Cancer: Multiple Subtypes within a Tumor? *Trends in Cancer*. 2017;3(11):753-760. doi:10.1016/j.trecan.2017.09.001
70. Duffy MJ, Crown J. A Personalized Approach to Cancer Treatment: How Biomarkers Can Help. *Clin Chem*. 2008;54(11):1770-1779. doi:10.1373/clinchem.2008.110056
71. Duffy MJ, Crown J. Companion Biomarkers: Paving the Pathway to Personalized Treatment for Cancer. *Clin Chem*. 2013;59(10):1447-1456. doi:10.1373/clinchem.2012.200477
72. Mohan G, T P AH, A J J, K M SD, Narayanasamy A, Vellingiri B. Recent advances in radiotherapy and its associated side effects in cancer—a review. *J Basic Appl Zool*. 2019;80(1):14. doi:10.1186/s41936-019-0083-5
73. Carelle N, Piotto E, Bellanger A, Germanaud J, Thuillier A, Khayat D. Changing patient perceptions of the side effects of cancer chemotherapy. *Cancer*. 2002;95(1):155-163.

- doi:10.1002/cncr.10630
74. Yang M, Liu P, Huang P. Cancer stem cells, metabolism, and therapeutic significance. *Tumor Biol.* 2016;37(5):5735-5742. doi:10.1007/s13277-016-4945-x
 75. Keeler A, ElMallah M, Flotte T. Gene Therapy 2017: Progress and Future Directions. *Clin Transl Sci.* 2017;10(4):242-248. doi:10.1111/cts.12466
 76. Dunbar CE, High KA, Joung JK, Kohn DB, Ozawa K, Sadelain M. Gene therapy comes of age. *Science* (80-). 2018;359(6372):eaan4672. doi:10.1126/science.aan4672
 77. Anguela XM, High KA. Entering the Modern Era of Gene Therapy. *Annu Rev Med.* 2019;70(1):273-288. doi:10.1146/annurev-med-012017-043332
 78. Lundstrom K. Viral Vectors in Gene Therapy. *Diseases.* 2018;6(2):42. doi:10.3390/diseases6020042
 79. Martinovich KM, Shaw NC, Kicic A, et al. The potential of antisense oligonucleotide therapies for inherited childhood lung diseases. *Mol Cell Pediatr.* 2018;5(1):10. doi:10.1186/s40348-018-0081-6
 80. Rinaldi C, Wood MJA. Antisense oligonucleotides: the next frontier for treatment of neurological disorders. *Nat Rev Neurol.* 2018;14(1):9-21. doi:10.1038/nrneurol.2017.148
 81. Duarte S, Carle G, Faneca H, Lima MCP de, Pierrefite-Carle V. Suicide gene therapy in cancer: Where do we stand now? *Cancer Lett.* 2012;324(2):160-170. doi:10.1016/j.canlet.2012.05.023
 82. Hu T, Li Z, Gao C-Y, Cho CH. Mechanisms of drug resistance in colon cancer and its therapeutic strategies. *World J Gastroenterol.* 2016;22(30):15. doi:10.3748/wjg.v22.i30.6876
 83. Housman G, Byler S, Heerboth S, et al. Drug Resistance in Cancer: An Overview. *Cancers (Basel).* 2014;6(3):1769-1792. doi:10.3390/cancers6031769
 84. Mansoori B, Mohammadi A, Davudian S, Shirjang S, Baradaran B. The Different Mechanisms of Cancer Drug Resistance: A Brief Review. *Adv Pharm Bull.* 2017;7(3):339-348. doi:10.15171/apb.2017.041
 85. Yamaoka T, Ohba M, Ohmori T. Molecular-Targeted Therapies for Epidermal Growth Factor Receptor and Its Resistance Mechanisms. *Int J Mol Sci.* 2017;18(11):22. doi:10.3390/ijms18112420
 86. Spaans JN, Goss GD. Drug Resistance to Molecular Targeted Therapy and Its Consequences for Treatment Decisions in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Front Oncol.* 2014;4(July):1-7. doi:10.3389/fonc.2014.00190
 87. Carper MB, Claudio PP. Clinical potential of gene mutations in lung cancer. *Clin Transl Med.* 2015;4(1):12. doi:10.1186/s40169-015-0074-1
 88. Amado RG, Wolf M, Peeters M, et al. Wild-Type KRAS Is Required for Panitumumab Efficacy in Patients With Metastatic Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(10):1626-1634. doi:10.1200/JCO.2007.14.7116
 89. Lièvre A, Bachet J-B, Boige V, et al. KRAS Mutations As an Independent Prognostic Factor in Patients With Advanced Colorectal Cancer Treated With Cetuximab. *J Clin Oncol.* 2008;26(3):374-379. doi:10.1200/JCO.2007.12.5906
 90. Beganovic S. Clinical Significance of the KRAS Mutation. *Bosn J Basic Med Sci.* 2010;9(1):S17-S20. doi:10.17305/bjbm.2009.2749
 91. Freitas RA. *Nanomedicine, Volume I: Basic Capabilities.* Vol 1. Landes Bioscience Georgetown, TX; 1999. <http://www.nanomedicine.com/NMI.htm>.
 92. Boisseau P, Loubaton B. Nanomedicine, nanotechnology in medicine. *Comptes Rendus Phys.* 2011;12(7):620-636. doi:10.1016/j.crhy.2011.06.001
 93. Hasan S. A Review on Nanoparticles : Their Synthesis and Types. *Res J Recent Sci Res J Recent Sci Uttar Pradesh (Lucknow Campus).* 2015;2277:1-3. https://d1wqtxts1xzle7.cloudfront.net/48401990/A_Review_on_Nanoparticles_Their_Synthesi20160829-31884-1x31tlc.pdf?1472462578=&response-content-disposition=inline%3B+filename%3DA_Review_on_Nanoparticles_Their_Synthesi.pdf&Expires=1607127752&Signature=EZb67.
 94. Tatar A-S, Nagy-Simon T, Tomuleasa C, Boca S, Astilean S. Nanomedicine approaches in acute lymphoblastic leukemia. *J Control Release.* 2016;238:123-138. doi:10.1016/j.jconrel.2016.07.035
 95. Nikalje AP. Nanotechnology and its Applications in Medicine. *Med Chem (Los Angeles).* 2015;5(2):81-89. doi:10.4172/2161-0444.1000247
 96. Kim BYS, Rutka JT, Chan WCW. Nanomedicine. *N Engl J Med.* 2010;363(25):2434-2443. doi:10.1056/NEJMra0912273
 97. Mendes R, Carreira B, Baptista P V., Fernandes AR. Non-small cell lung cancer biomarkers and targeted therapy - two faces of the same coin fostered by nanotechnology. *Expert Rev Precis Med Drug Dev.* 2016;1(2):155-168. doi:10.1080/23808993.2016.1159914

98. Tinkle S, McNeil SE, Mühlebach S, et al. Nanomedicines: addressing the scientific and regulatory gap. *Ann N Y Acad Sci.* 2014;1313(1):35-56. doi:10.1111/nyas.12403
99. Ferreira D, Fontinha D, Martins C, Pires D, Fernandes AR, Baptista P V. Gold nanoparticles for vectorization of nucleic acids for cancer therapeutics. *Molecules.* 2020;25(15). doi:10.3390/molecules25153489
100. Cabral RM, Baptista P V. Anti-cancer precision theranostics: a focus on multifunctional gold nanoparticles. *Expert Rev Mol Diagn.* 2014;14(8):1041-1052. doi:10.1586/14737159.2014.965683
101. Bao C, Conde J, Polo E, et al. A promising road with challenges: where are gold nanoparticles in translational research? *Nanomedicine.* 2014;9(15):2353-2370. doi:10.2217/nnm.14.155
102. Peer D, Karp JM, Hong S, Farokhzad OC, Margalit R, Langer R. Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy. *Nat Nanotechnol.* 2007;2(12):751-760. doi:10.1038/nnano.2007.387
103. Khawar IA, Kim JH, Kuh H-J. Improving drug delivery to solid tumors: Priming the tumor microenvironment. *J Control Release.* 2015;201:78-89. doi:10.1016/j.jconrel.2014.12.018
104. Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: Drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm.* 2015;93(March):52-79. doi:10.1016/j.ejpb.2015.03.018
105. Dreaden EC, Austin LA, Mackey MA, El-Sayed MA. Size matters: gold nanoparticles in targeted cancer drug delivery. *Ther Deliv.* 2012;3(4):457-478. doi:10.4155/tde.12.21
106. Fernandes AR, Jesus J, Martins P, et al. Multifunctional gold-nanoparticles: A nanovectorization tool for the targeted delivery of novel chemotherapeutic agents. *J Control Release.* 2017;245:52-61. doi:10.1016/j.jconrel.2016.11.021
107. Grzelczak M, Pérez-Juste J, Mulvaney P, Liz-Marzán LM. Shape control in gold nanoparticle synthesis. *Chem Soc Rev.* 2008;37(9):1783. doi:10.1039/b711490g
108. Kawamura G, Nogami M, Matsuda A. Shape-Controlled Metal Nanoparticles and Their Assemblies with Optical Functionalities. *J Nanomater.* 2013;2013:1-17. doi:10.1155/2013/631350
109. Cabral R, Baptista P. The chemistry and biology of gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: promises and challenges. *Nano Life.* 2013;03(03):1330001. doi:10.1142/S179398441330001X
110. Sajanlal PR, Sreepasad TS, Samal AK, Pradeep T. Anisotropic nanomaterials: structure, growth, assembly, and functions. *Nano Rev.* 2011;2(1):62. doi:10.3402/nano.v2i0.5883
111. Lin G, Mi P, Chu C, Zhang J, Liu G. Inorganic Nanocarriers Overcoming Multidrug Resistance for Cancer Theranostics. *Adv Sci.* 2016;3(11):14. doi:10.1002/advs.201600134
112. Baptista P, Conde J, Rosa J, Baptista P. Gold-Nanobeacons as a theranostic system for the detection and inhibition of specific genes. *Protoc Exch.* November 2013:1-35. doi:10.1038/protex.2013.088
113. Veigas B, Fortunato E, Baptista P V. Mobile based gold nanoprobe TB diagnostics for point-of-need. *Methods Mol Biol.* 2015;1256:41-56. doi:10.1007/978-1-4939-2172-0_3
114. Haiss W, Thanh NTK, Aveyard J, Fernig DG. Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra. *Anal Chem.* 2007;79(11):4215-4221. doi:10.1021/ac0702084
115. Sambrook J, Russel DW. Molecular Cloning: A Laboratory Manual,(pp. 8.46–8.53 and 11.37–11.42). 2001.
116. Bao C, Conde J, Curtin J, Artzi N, Tian F, Cui D. Bioresponsive antisense DNA gold nanobeacons as a hybrid in vivo theranostics platform for the inhibition of cancer cells and metastasis. *Sci Rep.* 2015;5(1):12297. doi:10.1038/srep12297
117. Mendes R, Fernandes A, Baptista P. Gold Nanoparticle Approach to the Selective Delivery of Gene Silencing in Cancer—The Case for Combined Delivery? *Genes (Basel).* 2017;8(3):16. doi:10.3390/genes8030094
118. Watts JK, Corey DR. Gene silencing by siRNAs and antisense oligonucleotides in the laboratory and the clinic. *J Pathol.* 2012;226(2):365-379. doi:10.1002/path.2993
119. Baptista P, Pereira E, Eaton P, et al. Gold nanoparticles for the development of clinical diagnosis methods. *Anal Bioanal Chem.* 2007;391(3):943-950. doi:10.1007/s00216-007-1768-z
120. Turkevich J, Stevenson PC, Hillier J. A study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. *Discuss Faraday Soc.* 1951;11:55-75.
121. Zhao, Jingyue and BF. *Synthesis of Gold Nanoparticles Via the Chemical Reduction Methods.* Shaker; 2017. <http://www.nanocon.eu/files/proceedings/23/papers/4231.pdf>.
122. Ji X, Song X, Li J, Bai Y, Yang W, Peng X. Size Control of Gold Nanocrystals in Citrate Reduction: The Third Role of Citrate. *J Am Chem Soc.* 2007;129(45):13939-13948. doi:10.1021/ja074447k

123. Kumar D, Meenan BJ, Mutreja I, D'Sa R, Dixon D. Controlling the size and size distribution of gold nanoparticles: A design of experiment study. *Int J Nanosci.* 2012;11(02):1250023. doi:10.1142/S0219581X12500238
124. Reddy V. Gold Nanoparticles: Synthesis and Applications. *Synlett.* 2006;2006(11):1791-1792. doi:10.1055/s-2006-944219
125. Suk JS, Xu Q, Kim N, Hanes J, Ensign LM. PEGylation as a strategy for improving nanoparticle-based drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev.* 2016;99:28-51. doi:10.1016/j.addr.2015.09.012
126. Jokerst J V., Lobovkina T, Zare RN, Gambhir SS. Nanoparticle PEGylation for imaging and therapy. *Nanomedicine.* 2011;6(4):715-728. doi:10.2217/nnm.11.19
127. Malvern Panalytical. Gold Nanoparticle Applications and Characterization by Nanoparticle Tracking Analysis Review of nanoparticle size and concentration analysis in gold colloid applications. *Med Mak.* 2017. https://www.atascientific.com.au/wp-content/uploads/2017/02/en_assets_AN161208GoldColloidSizeByNTA-6_tcm22-34639.pdf.
128. Veigas B, Machado D, Perdigão J, et al. Au-nanoparticles for detection of SNPs associated with antibiotic resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nanotechnology.* 2010;21(41):415101. doi:10.1088/0957-4484/21/41/415101
129. Liu X, Atwater M, Wang J, Huo Q. Extinction coefficient of gold nanoparticles with different sizes and different capping ligands. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.* 2007;58(1):3-7. doi:10.1016/j.colsurfb.2006.08.005
130. Baptista P, Doria G, Henriques D, Pereira E, Franco R. Colorimetric detection of eukaryotic gene expression with DNA-derivatized gold nanoparticles. *J Biotechnol.* 2005;119(2):111-117. doi:10.1016/j.jbiotec.2005.02.019
131. Watson JD, Crick FHC. Molecular structure of nucleic acids: a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature.* 1953;171(4356):737-738.
132. Bera B, Banerjee S, Das Sarkar M. *Nanoporous Silicon Prepared by Vapour Phase Strain Etch and Sacrificial Technique.* Vol 975.; 2015.
133. Danaei M, Dehghankhold M, Ataei S, et al. Impact of Particle Size and Polydispersity Index on the Clinical Applications of Lipidic Nanocarrier Systems. *Pharmaceutics.* 2018;10(2):57. doi:10.3390/pharmaceutics10020057
134. Dekkers BJW, Willems L, Bassel GW, et al. Identification of Reference Genes for RT-qPCR Expression Analysis in Arabidopsis and Tomato Seeds. *Plant Cell Physiol.* 2011;53(1):28-37. doi:10.1093/pcp/pcr113
135. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nat Protoc.* 2008;3(6):1101-1108. doi:10.1038/nprot.2008.73
136. Turabelidze A, Guo S, DiPietro LA. Importance of housekeeping gene selection for accurate reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction in a wound healing model. *Wound Repair Regen.* 2010;18(5):460-466. doi:10.1111/j.1524-475X.2010.00611.x
137. Suzuki T, Higgins PJ, Crawford DR. Control Selection for RNA Quantitation. *Biotechniques.* 2000;29(2):332-337. doi:10.2144/00292rv02
138. Wang J-H, Newbury LJ, Knisely AS, Monia B, Hendry BM, Sharpe CC. Antisense Knockdown of Kras Inhibits Fibrosis in a Rat Model of Unilateral Ureteric Obstruction. *Am J Pathol.* 2012;180(1):82-90. doi:10.1016/j.ajpath.2011.09.036
139. Ding Y, Jiang Z, Saha K, et al. Gold Nanoparticles for Nucleic Acid Delivery. *Mol Ther.* 2014;22(6):1075-1083. doi:10.1038/mt.2014.30

ANEXOS

7. Anexos

7.1. Preparação das soluções utilizadas

Tampão Fosfato 100 mM, pH 8 (500 mL).

- 1) Pesar para um copo 35,49 g de solução *stock* de Na_2HPO_4 , e adicionar água Milli-Q filtrada até perfazer 250 mL;
- 2) Pesar para outro copo 34,50 g de solução *stock* de $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$, e adicionar água Milli-Q filtrada até perfazer 250 mL;
- 3) Misturar noutro copo 46,6 mL da solução recém-preparada (1 M) Na_2HPO_4 e 3,40 mL da solução recém-preparada (1 M) $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$;
- 4) Adicionar ~450 mL de água Milli-Q filtrada até perfazer os 500 mL de volume final.

Tampão Fosfato 10 mM, pH 8 (250 mL).

- 1) Despejar 25 mL de tampão fosfato 100 mM, previamente preparado, num balão volumétrico;
- 2) Adicionar ~225 mL de água Milli-Q filtrada, até perfazer os 250 mL de volume final;

Solução AGE I: 2% (p/v) SDS, 10 mM Tampão Fosfato, pH 8 (100 mL).

- 1) Despejar 10 mL tampão fosfato 0,1 M;
- 2) Adicionar 2 g SDS;
- 3) Adicionar água Milli-Q filtrada até perfazer 100 mL de volume final.

Solução AGE II: 1,5 M NaCl, 0.01% (p/v) SDS, 10 mM Tampão Fosfato, pH 8 (100 mL).

- 1) Despejar 0,5 mL solução *stock* AGE I;
- 2) Adicionar 8,77 g NaCl;
- 3) Adicionar 10 mL de solução *stock* 0,1 M tampão fosfato pH 8;
- 4) Adicionar água Milli-Q filtrada até perfazer 100 mL de volume final.

7.2. Sequência *KRAS* (NCBI)

A sequência do gene *KRAS* foi retirada do NCBI (*Reference Sequence: NC_000012.12*).

>NC_000012.12:c25245895-25244075 Homo sapiens chromosome 12, GRCh38.p13 Primary Assembly (**abaixo apenas se encontra parte da seq**)

TCATGATTGAATTTTGTAAGGTATTTTGAAATAATTTTTCATATAAAGGTGAGTTTG
TATTAAAAGGTACTGGTGGAGTATTTGATAGTGTAATAACCTTATGTGTGACATGTT
CTAATATAGTCACATTTTCATTATTTTATTATAAGGCCTGCTGAAAATGACTGAAT
ATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAG
CTAATTCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAGGTAAATCTTGTT
TTAATATGCATATTACTGGTGCAGGACCATTCTTTGATACAGATAAAGGTTTCTCTG
ACCATTTTCATGAGTACTTATTACAAGATAATTATGCTGAAAGTTAAGTTATCTGAA

ATGTACCTTGGGTTTCAAGTTATATGTAACCATTAAATATGGGAACCTTTACTTTCCTT
 GGGAGTATGTCAGGGTCCA TGTGTTCACTCTCTG

Legenda: Exão 2, Codão de interesse, Primers Forward e Reverse – gDNA

7.3. Desenho de *primers*

Para a construção dos *primers* existem determinadas diretrizes que deverão ser seguidas. *Primers* pequenos são utilizados para amplificar fragmentos de DNA curtos e simples, amplificando produtos de DNA inespecíficos. Por outro lado, *primers* longos são utilizados em amplificações de DNA genómico, mas hibridam muito lentamente. De uma forma geral deverão ter um comprimento de 18-24 pb. O teor em G/C é importante, devendo estar entre os 40-60%, pois a ligação entre estas bases forma 3 pontes de hidrogénio, sendo esta mais forte e estável do que as ligações entre as bases A/T, as quais fazem 2 pontes de hidrogénio. Um outro parâmetro a ter em consideração é a temperatura de *melting* (T_m), sendo esta a temperatura na qual metade das moléculas oligonucleotídicas estão em cadeia simples e a outra metade em cadeia dupla. Este parâmetro é importante pois é nestes moldes que se baseiam as experiências de PCR e qPCR. T_m deverá ser entre os 50-60 °C, não diferindo em mais de 5 °C entre ambos os *primers* em utilização.

Para além dos fatores anteriormente descritos, é também importante que os mesmos não formem estruturas secundárias estáveis (*hairpins*), e que não se liguem nem entre eles (*selfdimer*) nem um com o outro (*heterodimer*). Por fim será necessário fazer um BLAST contra o genoma humano, de forma a garantir que a combinação de *primers* desenhada não irá amplificar nenhuma zona para além da desejada.

7.4. Sequenciação Sanger

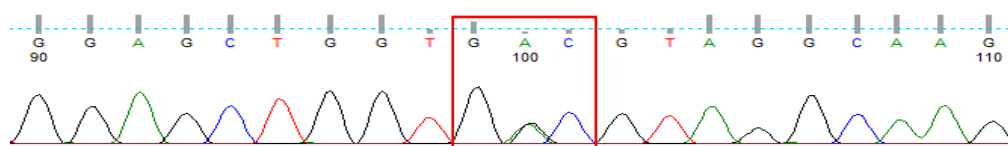


Figura 7.1 - Sequenciação Sanger efetuada pela STABVIDA à linha celular HCT116 com o *primer forward*.

Homo sapiens KRAS proto-oncogene, GTPase (KRAS), RefSeqGene (LRG_344) on chromosome 12

Sequence ID: [NG_007524.2](#) Length: 53215 Number of Matches: 1

Range 1: 10576 to 10932 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
640 bits(709)	2e-179	356/357(99%)	0/357(0%)	Plus/Plus
Query 19	ATATAGTCACATTTTCATTATTTTATTATAAGGCTGCTGAAAATGACTGAATATAAAC	78		
Sbjct 10576	ATATAGTCACATTTTCATTATTTTATTATAAGGCTGCTGAAAATGACTGAATATAAAC	10635		
Query 79	TTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGA	138		
Sbjct 10636	TTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGA	10695		
Query 139	ATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAGGTAAATCTTGTTTAAATATGCATAT	198		
Sbjct 10696	ATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAGGTAAATCTTGTTTAAATATGCATAT	10755		
Query 199	TACTGGTGCAGGACCATCTTTGATACAGATAAAGGTTTCTGACCATTTTCATGAGTA	258		
Sbjct 10756	TACTGGTGCAGGACCATCTTTGATACAGATAAAGGTTTCTGACCATTTTCATGAGTA	10815		
Query 259	CTTATTACAAGATAATTATGCTGAAAGTTAAGTTATCTGAAATGTACCTGGGTTTCAAG	318		
Sbjct 10816	CTTATTACAAGATAATTATGCTGAAAGTTAAGTTATCTGAAATGTACCTGGGTTTCAAG	10875		
Query 319	TTATATGTAACCATTAATATGGGAACCTTACTTTCCTTGGGAGTATGTCAGGGTCCA	375		
Sbjct 10876	TTATATGTAACCATTAATATGGGAACCTTACTTTCCTTGGGAGTATGTCAGGGTCCA	10932		

Figura 7.2 - BLASTn da sequenciação HCT116+F contra o genoma humano (NCBI).

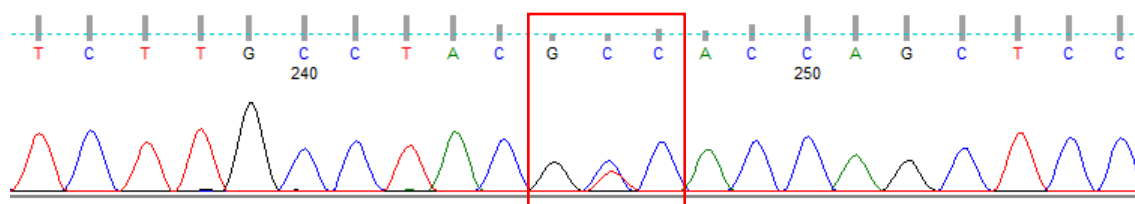


Figura 7.3 - Sequenciação Sanger efetuada pela STABVIDA à linha celular HCT116 com o *primer reverse*.

Homo sapiens KRAS proto-oncogene, GTPase (KRAS), RefSeqGene (LRG_344) on chromosome 12

Sequence ID: [NG_007524.2](#) Length: 53215 Number of Matches: 1

Range 1: 10531 to 10892 [GenBank](#) [Graphics](#)

▼ [Next Match](#) ▲ [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
646 bits(716)	0.0	360/362(99%)	0/362(0%)	Plus/Minus
Query 11	TTANTSGTTACNTATAAAGTGAACCAAGGTACATTTTCAGATAAAGTAACTTTTCAGCAT	70		
Sbjct 10892	TTAATSGTTACATATAAAGTGAACCAAGGTACATTTTCAGATAAAGTAACTTTTCAGCAT	10833		
Query 71	AATTATCTTGTAAATAAGTACTCATGAAATGGTCAGAGAAACCTTTATCTGTATCAAAGA	130		
Sbjct 10832	AATTATCTTGTAAATAAGTACTCATGAAATGGTCAGAGAAACCTTTATCTGTATCAAAGA	10773		
Query 131	ATGGTCCTGCACCAAGTAATATGCATATTAACAAGATTTACCTCTATTGTTGGATCATA	190		
Sbjct 10772	ATGGTCCTGCACCAAGTAATATGCATATTAACAAGATTTACCTCTATTGTTGGATCATA	10713		
Query 191	TTGTCACCAAAATGATTCTGAATTAGCTGTATCGTCAAGGCACTCTTGCTACGCCACC	250		
Sbjct 10712	TTGTCACCAAAATGATTCTGAATTAGCTGTATCGTCAAGGCACTCTTGCTACGCCACC	10653		
Query 251	AGCTCCAAC TACCACAAGTTTATATTCAGTCATTTTCAGCAGGCCTTATAATAAAAAATAA	310		
Sbjct 10652	AGCTCCAAC TACCACAAGTTTATATTCAGTCATTTTCAGCAGGCCTTATAATAAAAAATAA	10593		
Query 311	TGAAAATGTGACTATATTAGAACATGTCACACATAAGGTTAATACACTATCAAACTACTCC	370		
Sbjct 10592	TGAAAATGTGACTATATTAGAACATGTCACACATAAGGTTAATACACTATCAAACTACTCC	10533		
Query 371	AC 372			
Sbjct 10532	AC 10531			

Figura 7.4 - BLASTn da sequenciação HCT116+R contra o genoma humano (NCBI).

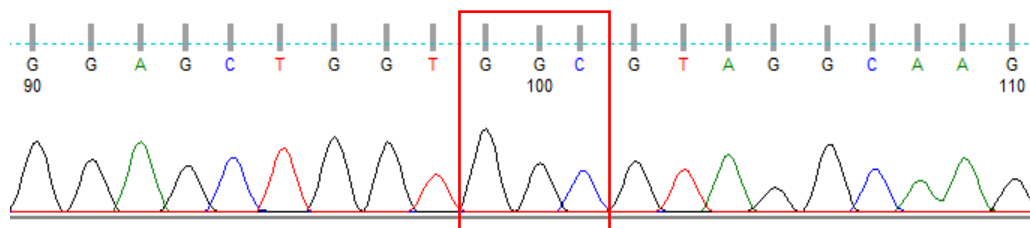


Figura 7.5 - Sequenciação Sanger efetuada pela STABVIDA à linha celular HT29 com o *primer forward*.

Homo sapiens chromosome 12, GRCh38.p12 Primary Assembly

Sequence ID: [NC_000012.12](#) Length: 133275309 Number of Matches: 1

Range 1: 25245072 to 25245433 [GenBank](#) [Graphics](#)

[▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
658 bits(356)	0.0	360/362(99%)	1/362(0%)	Plus/Minus

Features: [GTPase KRas isoform b](#)
[GTPase KRas isoform X2](#)

Query	15	TTCT-ATATAGTCACATTTTCATTATTTTATTATAAGGCCTGCTGAAAAAGACTGAATA	73
Sbjct	25245433	TTCTAATATAGTCACATTTTCATTATTTTATTATAAGGCCTGCTGAAAAAGACTGAATA	25245374
Query	74	TAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAAT	133
Sbjct	25245373	TAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAAT	25245314
Query	134	TCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAGGTAAATCTTGTTTTAATATG	193
Sbjct	25245313	TCAGAATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAGGTAAATCTTGTTTTAATATG	25245254
Query	194	CATATTACTGGTGCAGGACCATTTCTTGATACAGATAAAGGTTTCTCTGACCATTTTCAT	253
Sbjct	25245253	CATATTACTGGTGCAGGACCATTTCTTGATACAGATAAAGGTTTCTCTGACCATTTTCAT	25245194
Query	254	GAGTACTTATTACAAGATAATTATGCTGAAAGTTAAGTTATCTGAAATGTACCTTGGGTT	313
Sbjct	25245193	GAGTACTTATTACAAGATAATTATGCTGAAAGTTAAGTTATCTGAAATGTACCTTGGGTT	25245134
Query	314	TCAAGTTATATGTAACCATTAAATATGGGAACCTTACTTTCTTGGGAGTATGNCAGGGTC	373
Sbjct	25245133	TCAAGTTATATGTAACCATTAAATATGGGAACCTTACTTTCTTGGGAGTATGTCAGGGTC	25245074
Query	374	CA	375
Sbjct	25245073	CA	25245072

Figura 7.6 - BLASTn da sequenciação HT29+F contra o genoma humano (NCBI).

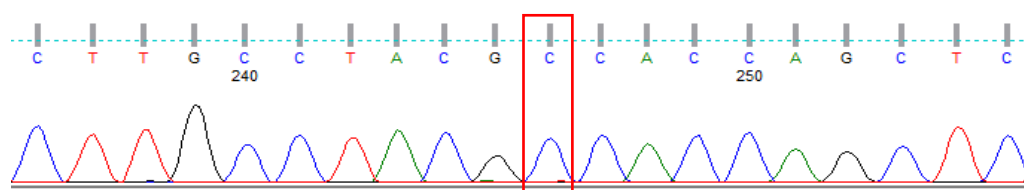


Figura 7.7 - Sequenciação Sanger efetuada pela STABVIDA à linha celular HT29 com o *primer reverse*.

Homo sapiens chromosome 12, GRCh38.p12 Primary Assembly

Sequence ID: [NC_000012.12](#) Length: 133275309 Number of Matches: 1

Range 1: 25245115 to 25245463 [GenBank](#) [Graphics](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
638 bits(345)	0.0	347/349(99%)	0/349(0%)	Plus/Plus

Features: [GTPase KRas isoform b](#)
[GTPase KRas isoform b](#)

Query	14	ATGNTTACNTATAA	CTTGAACCCAAGGTACATTT	CAGATAAACTTT	CAGCATAAT	73
Sbjct	25245115	ATGGTTACATATAA	CTTGAACCCAAGGTACATTT	CAGATAAACTTT	CAGCATAAT	25245174
Query	74	TATCTTGTAATAAGT	ACTCATGAAAATGGTCAGAGAAACCTTT	TATCTGTATCAAAGAATG		133
Sbjct	25245175	TATCTTGTAATAAGT	ACTCATGAAAATGGTCAGAGAAACCTTT	TATCTGTATCAAAGAATG		25245234
Query	134	GTCTGCACCAAGTAAT	ATGCATATTAACAAGATTACCTCTATT	GTTGGATCATATTC		193
Sbjct	25245235	GTCTGCACCAAGTAAT	ATGCATATTAACAAGATTACCTCTATT	GTTGGATCATATTC		25245294
Query	194	GTCCACAAAATGATTCT	GAAATAGCTGTATCGTCAAGGCACTCTT	GCCTACGCCACCAAGC		253
Sbjct	25245295	GTCCACAAAATGATTCT	GAAATAGCTGTATCGTCAAGGCACTCTT	GCCTACGCCACCAAGC		25245354
Query	254	TCCAACACCACAAGTTT	TATATTCAGTCATTTTCAGCAGGCCTT	AATAAAAAATAATGA		313
Sbjct	25245355	TCCAACACCACAAGTTT	TATATTCAGTCATTTTCAGCAGGCCTT	AATAAAAAATAATGA		25245414
Query	314	AAATGTGACTATATTAGA	ACATGTCACACATAAGGTTAATACACTATCA			362
Sbjct	25245415	AAATGTGACTATATTAGA	ACATGTCACACATAAGGTTAATACACTATCA			25245463

Figura 7.8 - BLASTn da sequencição HT29+R contra o genoma humano (NCBI).

7.5. Sequencias correspondentes aos testes de primers para RT-qPCR

Conjunto *primers* 1 (FAxR): Amplificação de 198 pb.

GGCTCAGCGGCTCCAGGTGCGGGA GACAGGCCCTCCTGAAAATGACTGAATATAA
 ACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCTAGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAA
 TTCAGAAATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAGGATTCCTACAGGAAG
 CAAGTAGTAATTGATGGAGAAACCTGTCTCTTGGATATTCTCGACACAGCAGGTCA
 AGAGGAGTACAGTGCATGAGGGACCACTACATGAGGACTGGGGAGGGCTTTCTT
 TGTGTATTTGCCATAAATAATACATAATCATTATTTGAAATATTCACCATTAATAGAGAA
 CAAATTAAAGAGTTAAGGACTCTGAAGATGTACCTATGGTCCTAGTAGGAAATAA
 ATGTGATTTGCCTTCTAGAACAGTAGACACAAAACAGGCTCAGGACTTAGCAAGAA
 GTTATGGAATTCCTTTTATTGAAACATCAGCAAAGACAAGACAGGGTGTGATGAT
 GCCTTCTATACATTAGTTTCGAGAAATTCGAAACATAAAGAAAAGATGAGCAAAG
 ATGGTAAAAAGAAAGAAAGAAAGTCAAAGACAAAGTGTGTAATTATGTAA

FA - GAG AGG CCT GCT GAA AAT GA

R - TGA CCT GCT GTG TCG AGA AT

Conjunto *primers* 2 (FBxR): Amplificação de 278 pb.

GCGGCTCGGCCAGTACTCCCGGCCCGCCATTTTCGGACTGGGAGCGAGCGCGGCG
 CAGGCACTGAAGGCGGCGGCGGGGCCAGAGGCTCAGCGGCTCCAGGTGCGGGAG
 AGAGGCCTGCTGAAAATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCT
 AGGCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAAATTCAGAAATCATTTTGTGGACGAATATG

ATCCAACAATAGAGGATTCCTACAGGAAGCAAGTAGTAATTGATGGAGAAACCTGT
 CTCTTGATATTCTCGACACAGCAGGTCAAGAGGAGTACAGTGCAAATGAGGGACCA
 GTACATGAGGACTGGGGAGGGCTTTCTTTGTGTATTTGCCATAAATAATACTAAATC
 ATTTGAAATATTACCATTTATAGAGAACAATAAAGAGTTAAGGACTCTGAAG
 ATGTACCTATGGTCCTAGTAGGAAATAAATGTGATTTGCCTTCTAGAACAGTAGAC
 ACAAACAGGCTCAGGACTTAGCAAGAAGTTATGGAATTCCTTTTATTGAAACATC
 AGCAAAGACAAGACAGGGTGTGTGATGATGCCCTTCTATACATTAGTTCGAGAAATTC
 GAAACATAAAGAAAAGATGAGCAAAGATGGTAAAAAGAAAGAAAGAGTCAA
 AGACAAAGTGTGTAATTATGTAA

FB - ATT TCG GAC TGG GAG CGA

R - TGA CCT GCT GTG TCG AGA AT

Conjunto *primers* 3 (FVxRV): Amplificação de 100 pb.

ATGACTGAATATAACTTGTTGGTAGTTGGAGCTGGTGGGTAGGCAAGAGTGCCTT
 GACGATACAGCTAATTCAGAAATCATTTTGTGGACGAATATGATCCAACAATAGAGG
 ATTCCTACAGGAAGCAAGTAGTAATTGATGGAGAAACCTGTCTCTTGATATTCTC
 GACACAGCAGGTCAAGAGGAGTACAGTGCAAATGAGGGACAGTACATGAGGACTG
 GGGAGGGCTTTCTTTGTGTATTTGCCATAAATAATACTAAATCATTGAAATATTC
 ACCATTATAGAGAACAATAAAGAGTTAAGGACTCTGAAGATGTACCTATGGTC
 CTAGTAGGAAATAAATGTGATTTGCCTTCTAGAACAGTAGACACAAAACAGGCTCA
 GGAAGTGTGATGATGCCCTTCTATACATTAGTTCGAGAAATTCGAAACATAAAGAA
 AAGATGAGCAAAGATGGTAAAAAGAAAGAAAGAGTCAAAGACAAAGTGTGTA
 ATTATGTAA

FV – TTG TGG ACG AAT ATG ATC CAA

RV – TGA CCT GCT GTG TCG AGA AT